

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



*PRODUCCIÓN DE H_2 A PARTIR DE LA CODIGESTIÓN DE CÁSCARAS DE
FRUTAS Y LODOS DE UNA PLANTA TRATADORA DE AGUA RESIDUAL A
ESCALA LABORATORIO*

Por

LIRIO MARÍA DEL TEPEYAC REYNA GÓMEZ

Como requisito parcial para obtener el Grado de
DOCTOR EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN QUÍMICA ANALÍTICA
AMBIENTAL

San Nicolás de los Garza, N.L. 2021

PRODUCCIÓN DE H₂ A PARTIR DE LA CODIGESTIÓN DE CÁSCARAS DE FRUTAS Y LODOS DE UNA PLANTA TRATADORA DE AGUA RESIDUAL A ESCALA LABORATORIO

Aprobación de la tesis

Dr. Juan Manuel Alfaro Barbosa

Dra. Ma. Guadalupe Sánchez Anguiano

Dra. Adriana Karina Leura Vicencio

Dr. Pasiano Rivas García

Sub- Director de Estudios de Posgrado

APOYOS RECIBIDOS

Al proyecto 249908 CONACyT-SENER-Sustentabilidad Energética, por el financiamiento otorgado para el desarrollo de este trabajo, bajo la dirección de Dr. Arquímedes Cruz López, a quien agradezco la oportunidad y la confianza que me brindó para trabajar en este proyecto.

A la Facultad de Ciencias Químicas y al Dr. Juan Manuel Alfaro Barbosa por haber aceptado ser el Director de este proyecto de tesis.

A las administraciones de la Facultad de Ingeniería Civil y al Dr. Benjamín Limón Rodríguez, Jefe del Dpto. de Ingeniería Ambiental del Instituto de Ingeniería Civil, FIC, por todo el apoyo otorgado para cumplir con el desarrollo de este proyecto.

Al Laboratorio de Investigación en Procesos Avanzados de Tratamiento de Aguas, UNAM, Campus Juriquilla, por la hospitalidad e infraestructura brindada durante mi breve pero productiva estancia.

Al Dr. Carlos Molina Guerrero por su apoyo y enseñanzas durante el arranque de este proyecto.

Al Dr. Armando Robledo Olivo por el apoyo, el tiempo y por compartir sus conocimientos con nuestro grupo de trabajo.

Al Comité Evaluador: Dra. Ma. Guadalupe Sánchez A., Dr. Karim Acuña Askar, Dr. Pasiano Rivas García y la Dra. Adriana Karina Leura Vicencio, a todos ellos gracias por su tiempo y por compartir sus conocimientos y críticas siempre constructivas en beneficio del desarrollo de este proyecto.

Contenido

APOYOS RECIBIDOS	3
Índice de Tablas.....	7
Índice de Figuras	8
Lista de acrónimos.....	10
1. INTRODUCCIÓN	13
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	21
2.1 Hipótesis.....	21
2.2 Objetivos.....	21
2.2.1 Objetivo general	21
2.2.2 Objetivos específicos.....	21
3. MARCO TEÓRICO	24
3.1 La energía eléctrica, situación actual de México.	24
3.2 Energía a partir de Biomasa	26
3.3 Tipos de residuos utilizados para la producción biológica de H ₂	28
3.3.1 Residuos sólidos urbanos	28
3.3.2 Generación de lodos en el tratamiento de agua residual	29
3.4 El hidrógeno	30
3.4.1 Hidrógeno como fuente de energía alternativa.....	31
3.4.2 Producción de hidrógeno.....	32
3.4.3 Bioprocesos para la producción de H ₂	34
3.5 Fermentación oscura	37
3.5.1 Productos y subproductos de la FO	40
3.5.2 Microorganismos de la FO	41
3.5.3 Factores ambientales importantes en la producción de biohidrógeno vía FO.....	42
3.5.3.1 Temperatura:	42
3.5.3.2 pH:.....	43
3.5.3.3 Tiempo de retención hidráulico (TRH).....	43
3.5.3.4 Nutrientes:	44
3.5.3.5 Presión parcial de H ₂	44

3.5.4 Reactores	45
3.6 Codigestión, antecedentes de la investigación	49
4. MATERIALES Y MÉTODOS	54
4.1 Metodología General	54
4.2 Obtención de sustratos e inóculos.....	54
4.2.1 Muestreo de los residuos de frutas (CFs).....	55
4.2.2 Muestreo de lodos	55
4.2.3 Inóculo.....	56
4.3 Caracterización de sustratos	56
4.4 Codigestión Anaerobia en biorreactores en lote	57
4.4.1 Preparación de biorreactores en lote.....	57
4.4.2 Monitoreo de los reactores	59
4.4.3 Producción de Biogás (volumen y composición) y AGVs	59
4.4.4 Análisis cinético de la producción de BH ₂	60
4.5 Operación del reactor anaerobio híbrido de flujo ascendente (RAHFA) de 1.4 L.....	60
4.5.1 Diseño y operación del proceso	60
4.5.2 Caracterización de la Cogestión a los Diferentes TRH.....	62
4.5.3 Diversidad microbiana	63
5. RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	66
5.1 Caracterización fisicoquímica de sustratos.....	66
5.2 Caracterización fisicoquímica de inóculos	68
5.3 Etapa 1. Reactores en lote	69
5.3.1 Producción de Biogás y BH ₂	69
5.3.2 Análisis cinético de la producción fermentativa de H ₂	72
5.3.3 Monitoreo de subproductos y otros parámetros	74
5.4 Etapa 2. Reactor anaerobio híbrido de flujo ascendente (RAHFA) a escala laboratorio.....	78
5.4.1. Preparación de mezcla de codigestión para la alimentación del reactor	78
5.4.2 Evaluación de los TRH de 24,12 y 6 h	79
5.4.3 Análisis de la diversidad microbiana.....	83
5.4.3.1 Diversidad microbiana en el Inóculo.....	84

6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	90
6.1 Conclusiones	90
6.2 Recomendaciones	91
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	92
8. Apéndice. Procedimientos de las determinaciones fisicoquímicas	109
8.1 pH.....	109
8.2 Humedad y Sólidos	109
8.3 Demanda Química de Oxígeno	110
8.4 Nitrógeno total Kjeldahl	110
8.5 Carbohidratos.....	113
8.6 Proteínas	113

Índice de Tablas

Tabla 3.1 Propiedades del H ₂	32
Tabla 3.2 Principales procesos de producción de H ₂	33
3 Características de las diferentes configuraciones de reactores empleados en la fermentación oscura.....	48
Tabla 4.1 Parámetros de caracterización de residuos de alimentos y lodos	57
Tabla 4.2 Matriz de diseño de experimentos Packett–Burman.....	58
Tabla 5.1. Caracterización de sustratos.....	67
Tabla 5.2 Características de los inóculos	68
Tabla 5.3 Resultados de la producción de biogás y BH ₂ para los experimentos en lote.	70
Tabla 5.4. Niveles de las diferentes variables y análisis estadístico para la producción de biogás del diseño de experimentos PB.	71
Tabla 5.5. Niveles de las diferentes variables y análisis estadístico para la producción de hidrógeno del diseño de experimentos PB.	72
Tabla 5.6 Coeficientes de la ecuación de Gompertz para la producción de hidrógeno a diferentes condiciones.	72
Tabla 5.7. Monitoreo de parámetros durante el proceso de codigestión de CFs y LP	75
Tabla 5.8 Comparativa del rendimiento en la producción de H ₂ de diversos estudios	77
Tabla 5.9 Características fisicoquímicas de la mezcla de codigestión.....	78
Tabla 5.10 Composición del biogás a diferentes TRH.	79

Índice de Figuras

Figura 1.1 Capacidad instalada y generación de energía en México para el año 2018.....	15
Figura 3.1 Clasificación de energías limpias.....	26
Figura 3.2 Formas de aprovechamiento de biomasa.....	27
Figura 3.3 Fuentes de la producción mundial de hidrógeno	34
Fig. 3.4 Procesos biológicos para la producción de H_2	35
Fig. 3.5 Etapas de la digestión anaerobia.....	38
Fig. 3.6 Esquema del mecanismo para la conversión de sustratos a H_2 vía fermentación oscura	40
Figura 4.1 Diagrama general de la metodología implementada para el proyecto sobre la producción de H_2	54
Figura 4.2 Esquema de la planta tratadora de aguas residuales municipales por lodos activados. Punto de muestreo de lodos primarios	55
Figura 4.3 Diagrama del proceso de codigestión en reactores en lote	57
Figura 4.4 Reactor anaerobio híbrido de flujo ascendente para la codigestión de CFs con LP	61
Figura 4.5. Esquema del reactor anaerobio híbrido de flujo ascendente con soporte para inóculo.	62
Figura 4.6 Procedimiento de extracción de ácidos nucleicos	63
Figura 5.1b Lodo anaerobio granular (LAG)	68
Figura 5.2 Gráfica de Pareto para producción de biogás.....	71
Figura 5.3 Gráfica de Pareto para producción de hidrógeno	71
Figura 5.4a Ajuste de la producción acumulativa de hidrógeno con la ecuación de Gompertz modificada para R14	73
Figura 5.4b Ajuste de la producción acumulativa de hidrógeno con la ecuación de Gompertz modificada para R13	73
Figura 5.5. Resultados de pH de los reactores de puntos centrales durante el proceso de FO.	76
Figura 5.6 Producción de ácido acético de los reactores de puntos centrales durante el proceso de FO	76
Figura 5.7. Producción de biogás y de BH_2 en el proceso de codigestión a TRH de 24, 12 y 6 h	80
Figura 5.8 pH y AGV's producidos durante los TRH de 24, 12 y 6 h.....	82
Figura 5.9 Etanol medido en el reactor a los TRH de 24 12 y 6 h.....	82
Figura 5.10. Consumo de CHT y remoción de DQO del proceso de codigestión a diferentes TRH.....	82
Figura 5.11. Productividad y rendimiento para BH_2 en el proceso de codigestión	83
Figura 5.12 Clasificación taxonómica hasta nivel Filo y su abundancia en el inóculo.	85

Figura 5.13. Clasificación taxonómica y abundancia del inóculo utilizado hasta nivel Familia.	85
Figura 5.14. Clasificación taxonómica y abundancia del inóculo hasta nivel especie	86
Figura 5.15 Evolución de la diversidad microbiana a nivel especie en el proceso de codigestión de cáscaras de frutas y lodos de una planta de tratamiento en un reactor híbrido de flujo ascendente a diferentes tiempos de retención hidráulicos 24, 12 y 6	87

Lista de acrónimos

AGVs	Ácidos grasos volátiles
BH ₂	Biohidrógeno
C/N	relación carbono/nitrógeno
CFs	Cáscaras de frutas
CG	Cromatografía de gases
CH ₄	Metano
CH ₃ CH ₂ COOH	Ácido acético
CH ₃ CH ₂ OH	Etanol
CHT	Carbohidratos totales
CMNUCC	Convención Marco de las Naciones Unidas sobre el cambio Climático
CNA	Comisión Nacional del Agua
CO ₂	Dióxido de carbono
CSTR	Reactor continuo tipo tanque agitado (por sus siglas en inglés)
DOF	Diario Oficial de la Federación
DQO	Demanda química de oxígeno
FHL	Formato hidrógeno liasa
FID	Detector de ionización de flama (por sus siglas en inglés)
FO	Fermentación oscura
GEI	Gases de Efecto de Invernadero
H ₂	Hidrógeno
H ₂ O	Agua
IEA	Agencia Internacional de Energía (IEA por sus siglas en inglés)
INECC	Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático Panel Intergubernamental de Cambio Climático (por sus siglas en inglés)
IPCC	
LA	Lodo anaerobio
LAG	Lodo anaerobio granular
LGCC	Ley General de Cambio Climático
LP	Lodo primario
MW	Megawatt
N ₂ O	Óxido de nitrógeno
NH ₃	Amoníaco
NTK	Nitrógeno total Keldahl
O ₃	Ozono
PB	<i>Plackett-Burman</i>
pH	Potencial hidrógeno
PTAR	Planta de tratamiento de agua residual

RAHFA	Reactor anaerobio híbrido de flujo ascendente
RE	Reforma Energética
SEN	Sistema Eléctrico Nacional
ST	Sólidos totales
STV	Sólidos totales volátiles
TCD	Detector de conductividad térmica (por sus siglas en inglés)
TRH	Tiempos de retención hidráulicos
UASB	Reactor anaerobio de flujo ascendente
UPBR	Reactor empacado de flujo ascendente por sus siglas en inglés
ZMM	Zona Metropolitana de Monterrey

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

Actualmente la sociedad debe enfrentarse a numerosos desafíos socioeconómicos y ambientales como resultado del incremento de la densidad de población, la migración desde zonas rurales a las urbanas y la expansión industrial. En materia ambiental el cambio climático y el agotamiento de los combustibles fósiles dirigen la necesidad de buscar alternativas de recursos energéticos sostenibles [1], para reducir los impactos negativos a través del uso adecuado de las energías renovables [2].

De acuerdo con la Agencia Internacional de Energía (IEA por sus siglas en inglés), más del 80 % de la energía primaria del mundo proviene de fuentes fósiles. Las reservas probadas de petróleo convencional se estiman alrededor de 1.3 billones de barriles y los recursos de petróleo recuperables representan alrededor de 2.7 billones de barriles. La tasa de reservas-producción basada en los niveles de consumo actuales, se encuentra entre los 40 a 45 años pudiendo ser extendida a medida que los recursos sean convertidos exitosamente en reservas. Sin embargo, el futuro uso de los combustibles fósiles será determinado por debates políticos y regulaciones gubernamentales que muestran preocupación en los ambientes locales por la emisión de Gases de Efecto de Invernadero (GEI) [3].

El Panel Intergubernamental de Cambio Climático (IPCC por sus siglas en inglés) define a los GEI como los gases que constituyen la atmósfera, pueden ser de origen natural y antropogénico, estos gases absorben y emiten radiación de la región del infrarrojo del espectro de la radiación electromagnética, emitido por la superficie de la Tierra, la atmósfera y las nubes. Esta propiedad causa el efecto invernadero. Entre los GEI primarios se encuentran: vapor de agua (H_2O), dióxido de carbono (CO_2), metano (CH_4), óxido de nitrógeno (N_2O) y ozono (O_3) [4]. El CO_2 de origen antropogénico es el GEI más significativo, y es uno de los responsables del calentamiento global. Es un gas inerte cuya concentración se

ha incrementado alrededor de 40% desde la era preindustrial, este gas puede permanecer en la atmósfera y ser transportado largas distancias [5].

Otro desafío al cual la sociedad se enfrenta actualmente es el aumento global de la generación de residuos sólidos urbanos (RSU) que va de la mano a la urbanización y hábitos de consumo. Los RSU son una categoría de las variedades de biomasa [6]. En el 2010 se produjeron a nivel mundial 1.3 billones de toneladas métricas de RSU, para el 2025 se estima la generación de 2.2 billones de toneladas métricas [2].

Aunado a la gran generación de RSU toma importancia la gestión de dichos residuos, su disposición en rellenos sanitarios pudiera traer consecuencias negativas cuando las construcciones de dichos rellenos no son adecuadas. Entre esas consecuencias se encuentra el riesgo a la salud humana por la contaminación del medio circundante (aire, suelo y agua subterránea) [7].

Debido a la problemática en materia ambiental antes expuesta, hoy en día, a nivel global, se están concentrando los esfuerzos de la sociedad y los gobiernos en desarrollar alternativas de energías renovables [8,9]. En México se apoya esta directriz, ya que al ser un país en vías de desarrollo contribuye aproximadamente con el 1.4% del total de las emisiones de CO₂ en el mundo [10], ubicándose dentro de los primeros 15 países con mayores emisiones reportadas en 2018 con 477 MtCO₂ [11], debido a esto, el gobierno mexicano se ha comprometido a disminuir las emisiones de GEI firmando los acuerdos generados en la Convención Marco de las Naciones Unidas sobre el cambio Climático (CMNUCC). La estrategia por seguir para lograrlo es implementar leyes como la Ley General de Cambio Climático (LGCC) publicada en el Diario Oficial de la Federación (DOF) en el año 2012, la cual determina que las políticas públicas deberán promover la sustitución gradual del uso y consumo de los combustibles fósiles, así como la generación de electricidad a través del uso de fuentes renovables de energía y la transferencia y desarrollo de tecnologías. Además, en 2018 se realizaron modificaciones a esta Ley entre las que se incluyen metas y conceptos del Acuerdo de París a los que México se ha comprometido, entre los

que destacan, limitar el incremento en la temperatura promedio del planeta al menos 2 °C, con esfuerzos por limitarlo a 1.5 °C [12].

En México para el año 2018, la capacidad instalada del Sector Energético Nacional fue de 82,412 MW. El 70 % corresponde a centrales eléctricas convencionales y 30 % a centrales eléctricas con tecnologías limpias (hidroeléctrica, eólica, cogeneración eficiente, fotovoltaica, nuclear, geotérmica, bagazo y biogás) (Figura 1.1) [13]. Mientras que en lo referente a generación de energía reportada en 2018 fueron generados 317,278 GW·h de energía, el 76 % de la electricidad proviene de tecnologías convencionales y el 24 % de tecnologías limpias [14].

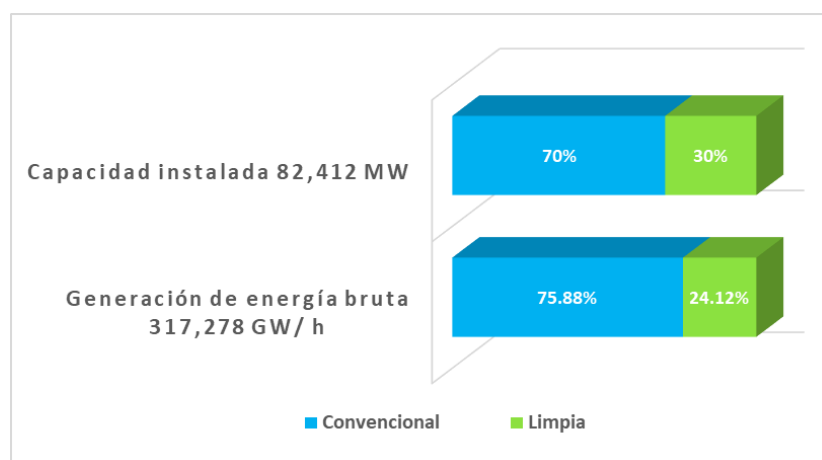


Figura 1.1 Capacidad instalada y generación de energía en México para el año 2018

Las tecnologías para la producción de biocombustibles se consideran relevantes por diferentes razones, entre las que destacan: contribuir con la cobertura de la demanda energética, aprovechamiento de residuos y la integración de diversos sectores socioeconómicos, es por esto que se dirigen los esfuerzos a la búsqueda de la transición de fuentes de energía fósiles a fuentes de energía renovables como bioetanol, biodiesel, biogás, biohidrógeno entre otros [15].

El término biohidrógeno hace referencia al hidrógeno que es producido por diferentes métodos a partir de biomasa [16]. A nivel mundial durante el año 2014, la capacidad de generación de energía neta a partir de biomasa fue 93,871 MW; la mitad se concentró en cuatro países: Estados Unidos, Brasil, China y Alemania.

Mientras que México solamente tiene el 0.4 % de la capacidad de generación con 366 MW [17], por ello es necesario seguir invirtiendo e investigando tecnologías que permitan aumentar el nivel de participación en este cambio que será benéfico para el desarrollo de la sociedad y del medio ambiente.

Las principales ventajas que presenta el uso del hidrógeno como vector energético son: 1) libera únicamente vapor de agua como subproducto de la combustión, 2) el H₂ presenta un alto contenido energético por unidad de masa en comparación con otros combustibles: 120.9 kJ·g⁻¹ del hidrógeno contra 48.3 y 44 kJ·g⁻¹ para gasolina y gas natural respectivamente [18]. Por lo tanto, si el hidrógeno es obtenido a partir de fuentes renovables es posible tener sistemas energéticos libres de CO₂ [19].

Entre las tecnologías para la producción biológica del hidrógeno se encuentran la biofotólisis directa e indirecta y la fotofermentación, ambos procesos son dirigidos por el uso de la energía lumínica y del agua [20]. Otro bioproceso es la fermentación oscura (FO), que forma parte de la digestión anaerobia, caracterizada por la degradación anaerobia de la materia orgánica por los microorganismos. Los sistemas de FO se describen con tasas de producción de hidrógeno de dos a cuatro órdenes de magnitud superiores que los sistemas de fotofermentación y biofotólisis [21].

El caso de la fermentación oscura atrae la atención debido a que involucra la transformación de una amplia variedad de sustratos orgánicos [22], entre los que se encuentran sustratos puros como glucosa, sacarosa, almidón [23], xilosa [24], galactosa, entre otros; así como sustratos complejos como suero de leche, aguas residuales, vinazas, residuos que contienen celulosa, lodos activados, residuos de alimentos, etc. [25,26]. Este bioproceso es afectado por factores críticos como: pH, temperatura, inóculo, sustratos, configuración del reactor, entre otros [27-31].

Es un hecho que la biomasa es el conjunto de biopolímeros más abundante en el planeta y una fuente alternativa a los combustibles fósiles. La biomasa ha sido categorizada como primera generación (cultivos agrícolas), segunda generación (residuos lingnocelulósicos) y tercera generación (algas) [32]. La segunda y

tercera generación tienen preferencia debido a que no son fuentes de alimentos, por lo tanto, no hay una competencia con la industria alimentaria por la biomasa o la tierra para cultivos [33]. Los residuos lignocelulósicos incluyen residuos naturales y forestales, residuos de cultivos no comestibles, residuos orgánicos industriales y municipales, residuos del procesamiento de alimentos y efluentes industriales [32].

En la actualidad las investigaciones para la producción de H_2 se centran en el aprovechamiento y valorización de biomasa que tiene un alto contenido de energía bioquímica almacenada en la materia orgánica, sin embargo, existen residuos que, a pesar de tener un alto contenido de materia orgánica, son difíciles de convertir para los microorganismos, resultando en bajo rendimiento de H_2 [34]. La característica que resulta ser un factor limitante en el proceso es la recalcitrancia de los compuestos [32].

Para el año 2018 la generación de biomasa en México ascendía a 278 Mt incluyendo residuos agrícolas y forestales, residuos sólidos urbanos, industriales, pecuarios, así como insumos agrícolas y forestales [35,36]. La utilización de este tipo de residuos como sustratos para la producción de biohidrógeno es una alternativa atractiva debido a su bajo costo al ser residuos y a su alta tasa de generación; 120 mil toneladas $día^{-1}$ de RSU, de los cuales se estima que los residuos aprovechables para la recuperación de energía rondan las 56 mil toneladas $día^{-1}$ [37] y 640 millones de toneladas $año^{-1}$ de lodos residuales en base seca PTAR [38]

La generación de RSU y la descomposición de la fracción orgánica en condiciones no controladas contribuyen al impacto ambiental causado por el hombre en las grandes metrópolis. La emisión de GEI, contaminación del suelo y la generación de malos olores constituyen problemas que deben atenderse para contribuir al bienestar de la población, así como al desarrollo sostenible [39]. La producción de combustibles a partir de residuos orgánicos cumple dos funciones; por una parte, la generación de energía limpia y por otra el tratamiento de los residuos [2].

En casos en los que algún residuo es difícil de degradar, una alternativa es mezclarlo con otro residuo de fácil degradación para coadyuvar al proceso de fermentación. Para el desarrollo de esta investigación se centra el interés en los sustratos de bajo costo como los residuos sólidos de alimentos, específicamente en la mezcla de cáscaras de tres frutas: melón, papaya y piña. Además del costo otra característica importante de este tipo de residuos es su aporte de carbohidratos y nutrientes al proceso, porque promueven la producción de H_2 , al combinarlos con lodos provenientes de una planta de tratamiento de agua residual (PTAR) durante el proceso de FO.

La producción de un vector energético empleando residuos debe ser factible económicamente, por lo que el interés siempre es maximizar su productividad y rendimiento con el fin de obtener la mayor cantidad de energía, optimizando costos de diseño y operación. Por lo tanto, resulta de primordial importancia realizar investigaciones con el fin de identificar la conveniencia de sustratos, así como las mejores condiciones para estos procesos.

En este estudio se buscó determinar el TRH adecuado para lograr la máxima productividad de BH_2 , para ello fue necesario encontrar, mediante el estudio en lote, el balance de carbón y nitrógeno, la temperatura y el tipo de inóculo que favoreciera este proceso. Para evaluar posteriormente el impacto de diferentes valores de TRH sobre la producción de BH_2 .

Después de presentar en este capítulo una descripción de la problemática ambiental derivada de las actividades antropogénicas y las bondades de implementar la FO como alternativa para aprovechar residuos orgánicos para la generación de energías alternas, así como la reducción simultánea de residuos orgánicos contaminantes. En el Capítulo 2 se propone la hipótesis y se enuncian el objetivo general y los objetivos particulares, que se desarrollaron durante este trabajo de investigación para demostrar la hipótesis. En el capítulo 3, se presenta el análisis de literatura sobre la necesidad de reducir la dependencia del petróleo y el desarrollo de tecnologías verdes y su potencial para la producción de un vector energético a partir de los sustratos generados en grandes ciudades. En el

capítulo 4 se mencionan las diferentes metodologías implementadas en el Laboratorio de ingeniería Ambiental de la Facultad de Ingeniería Civil sobre: i) la caracterización físico-química del inóculo y sustratos empleados en el proceso de codigestión en los reactores batch, ii) el monitoreo de los diferentes parámetros durante el proceso, iii) los análisis cromatográficos de gases permanentes y otros subproductos de la FO, y finalmente, iv) la operación y monitoreo del reactor continuo a escala laboratorio. En el capítulo 5 se presentan los resultados del diseño de experimentos de tipo *Plackett-Burman* (PB) para la evaluación del potencial de producción de H₂ vía FO. Para las diferentes codigestiones se emplearon residuos de frutas (cáscaras) con lodos provenientes de una planta de tratamiento de agua residual de la Zona Metropolitana de Monterrey (ZMM) con tres diferentes relaciones carbono/nitrógeno (20, 30 y 40), utilizando inóculos provenientes de procesos anaerobios, temperatura en el intervalo de 25 a 55 °C y pH variable. A partir de los resultados obtenidos, se seleccionaron los siguientes parámetros de operación: relación C/N=30, inóculo: lodo anaerobio granular y T=37 °C para trabajar la codigestión anaerobia en un reactor 1.4 L a tiempos de retención hidráulicos (TRH) de 24, 12 y 6 h, con el fin de evaluar la productividad y rendimiento del hidrógeno. Los resultados más sobresalientes indican la composición de hidrógeno alrededor de 30% y productividad 1150±91 mL H₂·L⁻¹·día⁻¹. Se analizó la diversidad microbiana para los TRH estudiados de 24,12 y 6 h identificando a la especie *Megaesphaera* como predominante y reportada como productora de H₂ al usar residuos de alimentos como sustratos. Finalmente, en el capítulo 6 se presentan las conclusiones obtenidas de este trabajo y las posibles líneas que podrían seguir explorando.

CAPÍTULO II

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1 Hipótesis

El balance de la relación Carbono Nitrógeno de la codigestión de lodos de una planta tratadora de agua residual y residuos de frutas permitirá la producción máxima de H_2 vía fermentación oscura en un reactor anaerobio de flujo ascendente continuo a escala laboratorio.

2.2 Objetivos

2.2.1 Objetivo general

Determinar la producción máxima de H_2 y la evolución de la diversidad microbiana en el proceso de codigestión de lodos de una planta de tratamiento de agua residual y residuos de frutas vía fermentación oscura en pruebas en lote y en un reactor a escala laboratorio.

2.2.2 Objetivos específicos

Caracterizar y acondicionar los sustratos empleados en el proceso de fermentación oscura para determinar las proporciones de cosustratos (relación C/N) a utilizar mediante ensayos en lote.

Monitorear los parámetros fisicoquímicos y la composición de H_2 , CO_2 , CH_4 , etanol (CH_3CH_2OH) y ácido acético (CH_3CH_2COOH) de reactores en lote.

Construcción y operación de un reactor anaerobio híbrido de flujo ascendente (RAHFA) a escala laboratorio.

Evaluar la producción de hidrógeno a diferentes valores de tiempo de retención hidráulico (TRH) de 24, 12 y 6 h en el RAHFA.

Monitorear parámetros fisicoquímicos del efluente del reactor y la composición del biogás producido.

Realizar el análisis microbiológico del reactor a escala laboratorio para los diferentes TRH estudiados.

CAPÍTULO III

MARCO TEÓRICO

3. MARCO TEÓRICO

3.1 La energía eléctrica, situación actual de México.

La energía eléctrica es un insumo básico que contribuye al desarrollo de la sociedad, repercutiendo directamente en el desarrollo económico de la misma. Por esta situación es de primordial importancia para los gobiernos garantizar el abasto de la electricidad de manera continua, lo que permite el bienestar de la población, así como mantener una calidad de vida adecuada. En 2018, en México, el consumo bruto de energía del Sistema Eléctrico Nacional (SEN) ascendió a 318,236 GWh, mostrando un incremento del 2.7 % respecto del consumo del 2017 [40]. De acuerdo con el escenario de planeación el consumo de energía eléctrica del SEN, se proyecta un crecimiento promedio anual del 3.1% entre el 2018 y el 2032 [41].

Para la generación de energía eléctrica los procesos se clasifican en tecnologías convencionales y tecnologías limpias. La Ley de la Industria Eléctrica establece que las energías limpias son aquellas fuentes de energía y procesos de generación de electricidad cuyas emisiones y residuos no rebasan los umbrales establecidos en las disposiciones reglamentarias. En la clasificación de tecnologías limpias entran aquellas que generan emisiones de CO₂ menores a 100 kg/MWh generado [42]. En el 2018 del total de la energía eléctrica generada el 76 % provino de tecnologías convencionales y el 24 % restante de tecnologías limpias [41].

Las tecnologías convencionales emplean combustibles fósiles y no cuentan con equipos de captura y confinamiento de CO₂ y de acuerdo al Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático (INECC), contribuyen con el 19 % de emisiones de GEI a nivel nacional, lo que se traduce en 127 Gt de CO₂ [42].

Actualmente el sector energético enfrenta cambios importantes, en nuestro país y en el mundo, relacionados con la disminución de combustibles fósiles, el crecimiento poblacional y la necesidad de cuidar el ambiente reduciendo la emisión de contaminantes que contribuyen al cambio climático.

En el año 2008 se publicó la llamada Reforma Energética (RE), esta reforma estableció las bases legales para el impulso de las energías renovables en México [43], cabe mencionar que, aunque se hicieron referencias a la sustentabilidad, la RE sigue considerando a los hidrocarburos como la clave para lograr competitividad económica y bienestar del pueblo mexicano. Posteriormente en 2013 se publicó en el DOF un decreto por el que se reforman y adicionan disposiciones en materia de energía. Como uno de los resultados esperados de la implementación de la llamada RE se ha concretado el ingreso de México a la Agencia Internacional de Energía (IEA por sus siglas en inglés), organismo líder en el desarrollo de energía sustentable. También se busca abrir oportunidades de cooperación mundial que garanticen la seguridad energética, promuevan el desarrollo económico y la sostenibilidad ambiental. Algunos puntos clave de esta reforma están relacionados con cambio climático, energías limpias, eficiencia energética y competitividad en los mercados.

Entre las leyes secundarias que fueron publicadas para la aplicación de la Reforma se encuentra la Ley de Transición Energética cuyo objetivo es promover la inversión en la generación de electricidad con energías limpias. Las metas establecidas para generación de electricidad a través de energías limpias, buscan detonar el desarrollo de métodos alternos de generación, así como la inversión en tecnologías que mejoren la eficiencia del sector. Estas metas son las siguientes: generar 25% para el 2018, incrementar a 30% para el 2021 y 35% para el 2024 [42]. Se debe mencionar que las energías renovables no son el equivalente a las energías limpias, más bien las energías renovables forman parte de las energías limpias (Figura 3.1) [43].

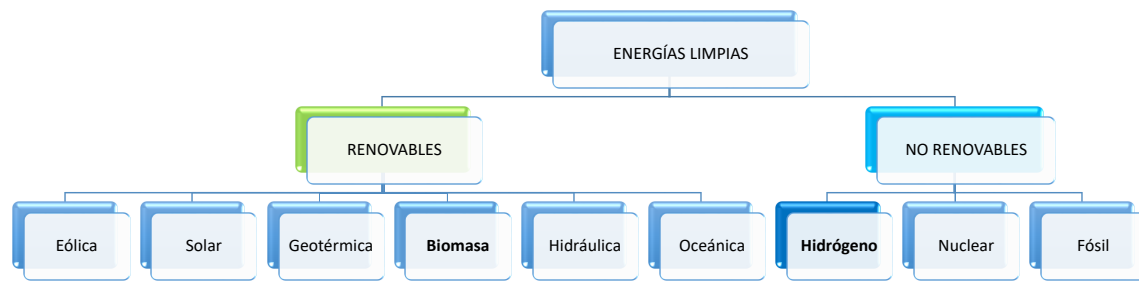


Figura 3.1 Clasificación de energías limpias

Aunque de momento se mantiene la Ley de Transición Energética que contempla incrementar gradualmente la participación de energías limpias, para la administración del Gobierno Federal actual el planteamiento para lograr la soberanía energética de México es el rescate de Petróleos Mexicanos (PEMEX), reactivando todos sus procesos de producción. Para esto se contempla la perforación de 107 pozos, así como el aumento de las inversiones en exploración en un 10% anual, y se pretende alcanzar una producción de 2 millones 400 mil barriles de petróleo diarios para el año 2024 [44].

3.2 Energía a partir de Biomasa

Esta energía obtenida a partir de biomasa también es conocida como bioenergía. El término biomasa hace referencia al material orgánico no fosilizado y biodegradable derivado de organismos vivos o que estuvieron vivos recientemente, como plantas y animales [45]. La biomasa puede ser usada como calor (incinerando la biomasa), biocombustible y biogás. En la Figura 3.2 se muestra la clasificación de los usos de la biomasa [45].

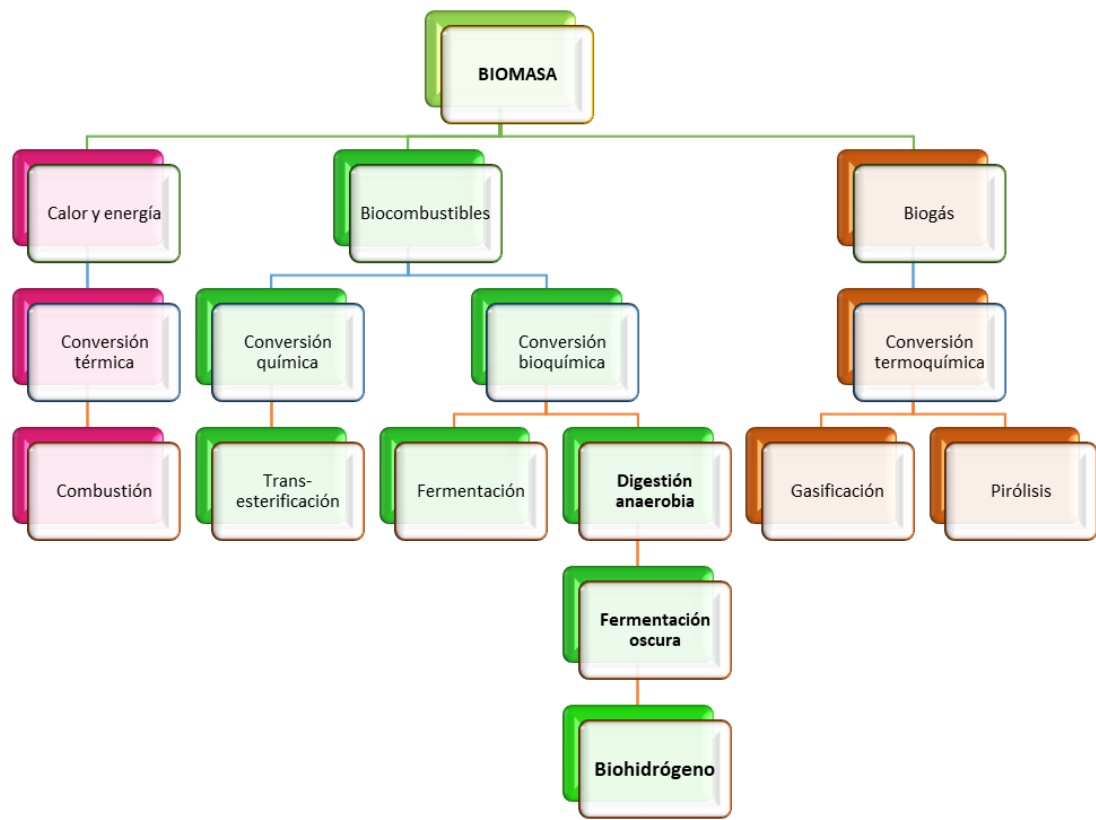


Figura 3.2 Formas de aprovechamiento de biomasa.

El aprovechamiento energético del poder calórico de la biomasa depende de su naturaleza como los residuos industriales, las aguas residuales, lodos residuales de PTAR (poder calorífico de $7000\text{--}9500 \text{ kJ m}^{-3}$) [46] los residuos sólidos urbanos ($6750\text{--}12280 \text{ kJ kg}^{-1}$) [47] y el estiércol de animales ($819\text{--}937 \text{ kJ m}^{-3}$) [48]. Desde el punto de vista ambiental se considera que dicho aprovechamiento no contribuye al aumento de los gases de efecto invernadero, dado que el balance global de las emisiones de CO_2 a la atmósfera es neutro [49].

Es importante diferenciar el biocombustible del biogás. El término biocombustibles se refiere a los combustibles líquidos que se producen por procesos termoquímicos y bioquímicos a partir materiales como plantas,

animales y otros organismos. En contraste, el biogás es producido por la digestión anaerobia del material biológico y es utilizado para producir electricidad y calor, compuesto principalmente por CH₄, CO₂, y en menor proporción por H₂, H₂S y NH₄⁺ [45].

Nuestro país cuenta con 77 plantas generadoras lo que representa el 1.1% de la capacidad total instalada del país y que emplearon algún tipo de biocombustible en el 2017. De ese 1 %, en los estados de Veracruz, Nuevo León y Jalisco se concentró el 54 % del total de la capacidad total de esta tecnología debido al aprovechamiento de residuos orgánicos en los ingenios azucareros y del procesamiento de los residuos sólidos urbanos [41].

3.3 Tipos de residuos utilizados para la producción biológica de H₂

La agricultura y la industria alimentaria representan las principales fuentes generadoras de residuos ricos en carbohidratos complejos como almidón, de proteínas y celulosa, sustratos potenciales para la producción de hidrógeno [50]. Además, que contienen alrededor del 90 % de sólidos volátiles que favorecen la degradación microbiana [51, 52].

3.3.1 Residuos sólidos urbanos

La generación y el manejo de los RSU representan un desafío, así como áreas de oportunidad a nivel global. La composición de estos residuos puede variar dependiendo del desarrollo económico, cultura, clima y recursos energéticos de cada país. En países en desarrollo la mayor proporción de residuos generados es de tipo orgánico. Un reporte del Banco Mundial estima que se puede incrementar de 1.3 (generadas actualmente) a 2.2 millones de toneladas por año de residuos para el año 2025 [53]. Estas cifras muestran la gran necesidad de buscar estrategias para gestionar estos residuos.

En México, el manejo de los RSU, compete a los municipios de acuerdo al artículo 10 de la Ley General para la Prevención y Gestión Integral de los Residuos.

La SEMARNAT estima que en México se generan poco más de 42 millones de toneladas de RSU al año, con una producción *per cápita* de 1 kg al día. De acuerdo a lo reportado, la composición de los residuos sólidos corresponde a 52% de residuos orgánicos (residuos de comida, jardín, etcétera), el 34% de residuos potencialmente aprovechables (14 % desechos de papel y cartón, 11 % plásticos, 6 % vidrio y 3 % metales); y el 13 % restante se integra de otros residuos (12 %) y textiles (1 %) [54], mientras que en el área Metropolitana de Monterrey en el 2017 se generaron 800 mil toneladas de residuos orgánicos [55]. Sin embargo, se ha reconocido que los residuos de alimentos constituyen un severo problema ambiental en México y el mundo, al no contarse con la infraestructura necesaria para gestionar el manejo y disposición del total de los RSU [56].

En el Inventario Nacional de emisiones de Gases de Efecto Invernadero de 2013 se reportó que de las 665 Mt de CO₂ emitidas, el 4.6% corresponde al sector de residuos que incluye aguas residuales industriales, tratamiento biológico, incineración de residuos peligrosos y quema a cielo abierto. Con el fin de minimizar la generación y maximizar la valorización de residuos sólidos urbanos, de manejo especial y peligrosos, bajo criterios de eficiencia ambiental, tecnológica, económica y social, se promueven instrumentos como los planes de manejo, ya que fomentar el uso de los residuos como fuente de energía renovable es uno de los objetivos que persigue la SEMARNAT.

3.3.2 Generación de lodos en el tratamiento de agua residual

En la Agenda del Agua 2030, uno de los grandes retos que se plantearon fue tratar toda el agua residual del país [57]. De acuerdo con los datos reportados en el año 2016 se generaron 7,200 millones de m³ de agua residual municipal (229 m³·s⁻¹), se recolectaron en el alcantarillado 212 m³·s⁻¹ equivalente al 93 %, sin embargo, solo se trataron 124 m³·s⁻¹, la cobertura de tratamiento fue solo del 58 % [58].

Existe una gran cantidad de materia orgánica que llega a los cuerpos de agua naturales ocasionando el detrimento de estos. Cuando los sistemas de tratamiento se diseñaron y construyeron, el único propósito de estas instalaciones era remover agentes peligrosos para descargar el efluente tratado a los cuerpos de agua. En aquel momento los costos energéticos eran bajos y la escasez del agua y el cambio climático no eran aspectos ambientales que se consideraran preocupantes. Sin embargo, recientemente los problemas asociados con la disposición de los lodos de las plantas de tratamiento han cambiado su enfoque tradicional, al tratar de aprovechar los nutrientes como fósforo y nitrógeno así como el contenido energético de la materia orgánica [59].

Los procesos de tratamiento para la remoción de contaminantes del agua residual generan diferentes subproductos, principalmente arenas y lodos. Los lodos residuales son un problema por el costo adicional que implica su tratamiento, así como por los volúmenes que se generan. El proceso de lodos activados genera la mayor cantidad de lodos residuales. A nivel nacional se cuenta con 709 plantas con este tipo de proceso, representan el 60% del gasto tratado, para un caudal de operación de $66.2 \text{ m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$ [60]. Como resultado del tratamiento de las aguas residuales, usando lodos activados la producción de sólidos secos es de $70\text{-}100 \text{ kg} / 1000 \text{ m}^3$ [61]. El 51% de los lodos producidos son estabilizados en digestores anaerobios, sin embargo, no se recupera el biogás generado durante este proceso ya que los lodos son enviados a disposición final en rellenos sanitarios, lo que ocasiona ocupar un gran espacio para su disposición. Además las emisiones de gases provenientes de los rellenos sanitarios en el mundo están causando impactos ambientales globales, debido a la composición del gas, enriquecido con metano, si bien este gas puede ser aprovechado para la producción de energía, la realidad muestra que de los 75 billones m^3 producidos, menos del 3 % se utiliza para producir energía. [53]

3.4 El hidrógeno

El hidrógeno elemental ocurre libremente en la naturaleza en cantidades despreciables, sin embargo, es químicamente activo y se encuentra en una

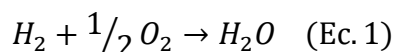
amplia variedad de compuestos en combinación con otros elementos [62]. El hidrógeno es aproximadamente 14 veces menos denso que el aire [20], y tiene un muy bajo índice de ignición de 0.0254 mJ [14]. Actualmente alrededor del 81 % del hidrógeno producido se genera partir de combustibles fósiles, gas natural, carbón y petróleo [62], que generan emisiones de GEI como óxidos de carbono óxido de dinitrógeno, que contribuyen al calentamiento global [63]. Un porcentaje alrededor del 4 %, es producido a partir de la electrólisis del agua [64].

3.4.1 Hidrógeno como fuente de energía alternativa

Debido a la preocupación actual por el cuidado del medio ambiente se ha realizado un número importante de investigaciones relacionadas con la generación de energía. En la búsqueda de combustibles alternativos se considera al H_2 como una fuente de energía limpia.

El hidrógeno no es una fuente de energía primaria, ya que no existe libremente en la naturaleza, es más bien un portador de energía. Entre sus propiedades como vector energético (que almacena o transporta energía) se pueden mencionar: su velocidad de combustión rápida, la velocidad de flama es casi un orden de magnitud más alta que la gasolina, octanaje altamente efectivo, no es tóxico o formador potencial de ozono, además presenta una muy baja energía de ignición (0.02 MJ), sin embargo, presenta una baja densidad por lo que se necesita un gran volumen para almacenarlo [15].

El hidrógeno reacciona con el oxígeno para producir energía y agua (Ec. 1). Esta es la base de la llamada energía del hidrógeno.



$$\Delta H^\circ = -285 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1} \text{ a } 25^\circ\text{C}$$

$$\Delta G^\circ = -237 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1} \text{ a } 25^\circ\text{C}$$

Tiene un alto rendimiento energético de $122 \text{ kJ} \cdot \text{g}^{-1}$ el cual es hasta 2.75 veces mayor que el de los combustibles hidrocarbonados como metano, gas natural, biodiésel y etanol [57].

Las propiedades del H₂ como combustible se enlistan en la Tabla 3.1 [16]:

Tabla 3.1 Propiedades del H₂

Propiedad	Valor	Unidades
Punto de ebullición	20.41	K
Punto de fusión	13.97	K
Densidad	70.8	kg·(m ³) ⁻¹
Calor específico a presión constante	14.89	kJ·kg ⁻¹ K ⁻¹
Límite de explosión en el aire	4 a 75	% vol
Energía de ignición en el aire	0.02	mJ
Temperatura de ignición	585	K
Temperatura de flama en el aire	2318	K
Mezcla estequiométrica con el aire en cámara de combustión	29.53	%
Velocidad de flama	2.75	cm·s ⁻¹
Calor de combustión (inferior-superior)	119.9-141.9	MJ·kg ⁻¹

La demanda de hidrógeno no es exclusiva como fuente de energía, ya que es ampliamente utilizada en la industria química, de alimentos y en la producción de derivados electrónicos entre otros, creando la necesidad de generar hidrógeno de manera sostenible y viable desde el punto de vista económico. Según A. Bedoya y col., se reportó una demanda de 50 millones de toneladas anuales de H₂ con un crecimiento de 10% anual [67].

3.4.2 Producción de hidrógeno

El H₂ puede ser producido por un gran número de procesos, los principales se enlistan en la Tabla 3.2, sin embargo, los métodos actuales no son lo suficientemente eficientes y económicos para suplir las necesidades del H₂ y la producción convencional se caracteriza por altos costos energéticos del proceso [67].

Tabla 3.2 Principales procesos de producción de H_2

Método	Proceso	Fuente de alimentación
Térmico	Reformado de vapor	Gas natural
	Pirólisis	Biomasa
	Gasificación	Carbón, biomasa
Electroquímico	Electrólisis	Agua
	Fotoelectroquímico	Agua
Biológico	Fotobiológico	Agua y algas
	Microorganismos fermentativos	Cepas
	Digestión anaerobia	Biomasa

En la actualidad la mayor producción de hidrógeno es por reformado de metano al ser la alternativa más económica entre los procesos comerciales actuales. La producción mundial rebasa 1 billón de $m^3 \cdot día^{-1}$. En la Figura 3.3 se presentan los datos de producción de H_2 a partir de gas natural ($\Delta H = +49 \text{ kJ mol}^{-1}$), petróleo, carbón ($\Delta H = +172.4 \text{ kJ mol}^{-1}$) y electrólisis del agua, sin embargo, son procesos con un consumo intensivo de energía [68], además la producción basada en fuentes fósiles incrementa la emisión de GEI [30]. Existe entonces la necesidad de desarrollar tecnologías limpias y sustentables para la producción de energía. La producción de hidrógeno a partir de biomasa siguiendo rutas biológicas es una alternativa amigable con el ambiente [66], que se lleva a cabo a condiciones ambientales ($35 \text{ }^\circ\text{C}$ y presión atmosférica), utiliza residuos como sustratos y además no hay emisiones significativas de CO_x , NO_x y SO_x [69].

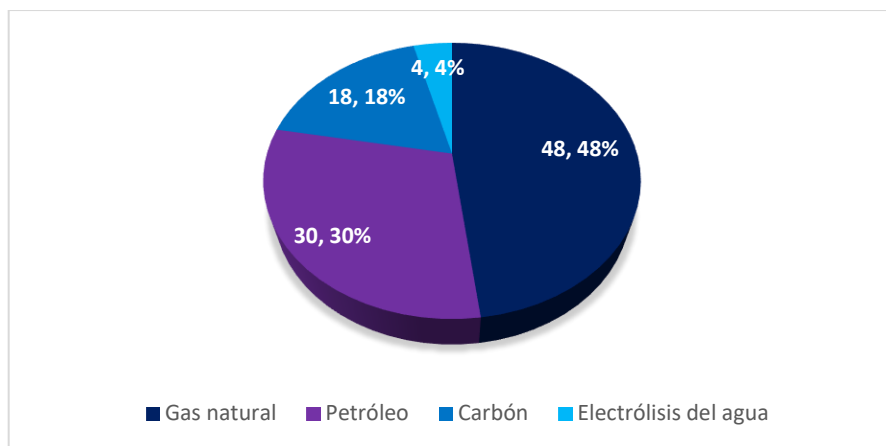


Figura 3.3 Fuentes de la producción mundial de hidrógeno

3.4.3 Bioprocesos para la producción de H_2

Como alternativa para la producción de hidrógeno limpio o biohidrógeno (BH_2), se encuentran los procesos biotecnológicos que utilizan materiales o fuentes de naturaleza renovable que se apoyan de microorganismos para la degradación de estos sustratos. La investigación acerca de la producción biológica de hidrógeno se ha visto incrementada en lugares donde se facilita el acceso a la biomasa o residuos que pueden ser aprovechables.

El hidrógeno que se obtiene como subproducto del metabolismo de los microorganismos involucra el desarrollo de tecnologías que pueden clasificarse en procesos dependientes de la luz como biofotólisis y fotofermentación, o independientes de la luz como la FO, celdas microbianas [31] o por combinación de las anteriores [70]. En La Figura 3.4 se muestra la clasificación de los bioprocesos mencionados anteriormente.

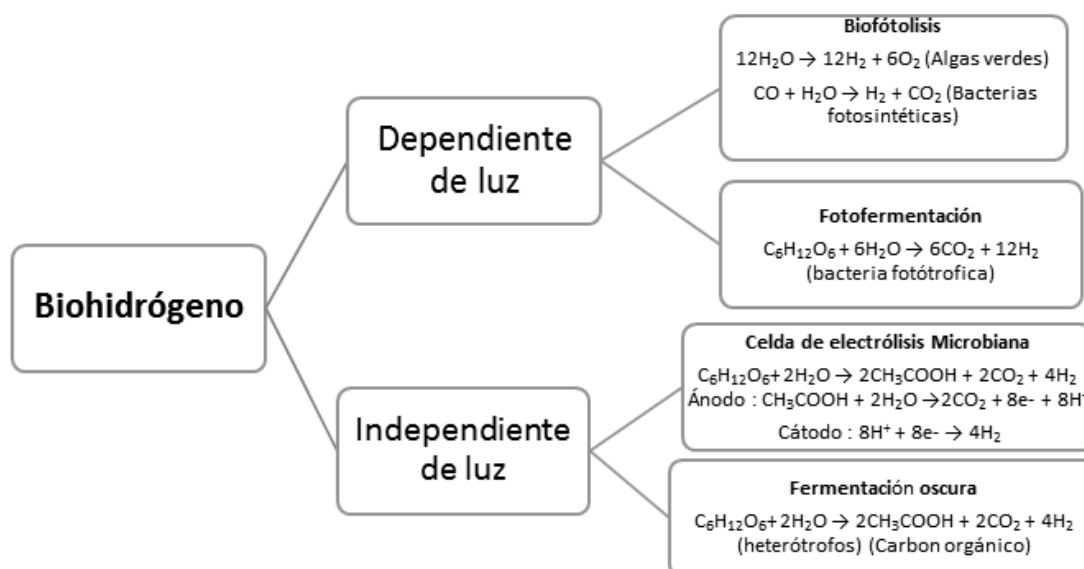


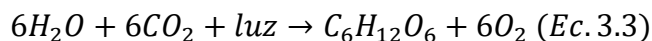
Figura 3.4 Procesos biológicos para la producción de H_2

3.4.3.1 La Biofotólisis

Está asociada con la fotosíntesis de las plantas, utiliza energía luminosa para la generación de hidrógeno mediante electrones provenientes del agua, generalmente es realizada por algas verdes y cianobacterias bajo condiciones anaerobias. Los mecanismos bioquímicos para la producción de hidrógeno para los procesos de fotólisis directa o indirecta son diferentes. Para el primer caso, la energía luminosa genera un gradiente de protones y proporciona electrones ya sea a partir de una reacción de rompimiento de agua, mientras que en la segunda vía la fotosíntesis se lleva a cabo por medio de cianobacterias y algas verde-azules denominadas o conocidas como paralelo II (PSII) y que tienen origen en el rompimiento de las moléculas de almidón. En algas verdes y cianobacterias la luz funciona como la fuerza que conduce a PSII y resulta en la producción de equivalentes oxidantes, los cuales se usan para oxidar el agua en electrones, protones y oxígeno a través de la biofotólisis directa, que se representa por la siguiente reacción [70].



La biofotólisis indirecta y la producción de H₂ es llevada a cabo por cianobacterias filamentosas [71]. Las ecuaciones 3.3 y 3.4 representan el mecanismo general de la producción de H₂ por las cianobacterias [72,73].



En la primera etapa se da una gran producción de biomasa a través de la biofotólisis para aumentar la biomasa rica en carbohidratos (Ec. 3.3). Durante el proceso de fotosíntesis el carbono reducido es almacenado como carbohidratos endógenos en las cianobacterias y como almidón en microalgas, La segunda etapa usa la biomasa almacenada en la fermentación para producir H₂ (Ec. 3.4) [63,74].

En este proceso las tasas de producción son muy variadas y dependen fuertemente de las especies de cianobacterias involucradas y de las condiciones de proceso. Sin embargo, el interés de estudiar esta ruta ha decaído debido a la baja producción de H₂ reportada.

➤ 3.4.3.2 La fotofermentación

Se le conoce como fotofermentación a la conversión fermentativa de sustratos orgánicos (contenido en materiales de desecho) por un grupo de bacterias fotosintéticas que usan la luz solar como energía para convertir sustratos orgánicos en hidrógeno y CO₂. Este proceso se lleva a cabo en condiciones anóxicas, por cuatro especies de bacterias púrpuras no sulfurosas (PNS) principalmente (aunque existen numerosos tipos de bacterias que pueden ser usadas): *Rhodobacter sphaeroides*, *Rhodopseudomonas palustris*, *Rhodobacter capsulatus* y *Rhodospirillum rubrum* [70, 75]. Se ha observado que la tasa de producción de hidrógeno es más alta cuando las células son inmovilizadas que cuando están suspendidas en la fase líquida de hecho, el género de microorganismos *Rhodobacter* en diferentes configuraciones de reactores se han desarrollado para esta reacción, desafortunadamente las bajas eficiencias fotoquímicas (3-10%) hacen poco atractivo este bioproceso [73].

Las celdas de electrólisis microbiana denominadas MEC por sus siglas en inglés (*microbial electrolysis cell*), utilizan microorganismos activos electroquímicamente, los cuales, al aplicarles un voltaje moderado, convierten la materia orgánica disuelta en hidrógeno dentro de la celda [76].

3.4.3.3 La fermentación oscura

La fermentación oscura produce H_2 a partir de compuestos orgánicos por la acción de microorganismos fermentativos productores de H_2 ; que pueden ser anaerobios facultativos o anaerobios obligados [77], sus ventajas sobre los otros bioprocesos consisten en la simplicidad del proceso, el bajo requerimiento energético, las altas tasas de producción de H_2 [78] y la posibilidad de utilizar residuos de bajo costo como materia prima [79]. En la siguiente sección se describe el proceso con mayor detalle.

3.5 Fermentación oscura

La FO empieza con la hidrólisis del material orgánico que es la fuente de alimento en la cual se rompen las cadenas de los polímeros insolubles haciéndolos disponibles para los microorganismos. Las bacterias acidogénicas convierten después esos productos de hidrólisis en hidrógeno, amonio, alcoholes y ácidos orgánicos [22].

En la FO los sustratos ricos en carbohidratos son degradados anaeróbicamente por microorganismos anaerobios facultativos y anaerobios obligados. Estos microorganismos ayudan para la generación del poder reductor (NADH, FADH). El H_2 molecular es producido en el proceso de disponer los electrones a través de la actividad de la enzima hidrogenasa. Bajo estas condiciones los protones pueden actuar como aceptores de electrones, para neutralizar los electrones generados por la oxidación de sustratos orgánicos con la consecuente formación del H_2 [30].

La digestión anaerobia (Figura 3.5) se lleva a cabo en cuatro etapas sucesivas que son: hidrólisis, acidogénesis, acetogénesis y metanogénesis, y la fermentación oscura es un paso intermedio [80]. La formación de hidrógeno

comienza con la hidrólisis, en la cual los compuestos orgánicos complejos (carbohidratos, proteínas y lípidos) son transformados a compuestos simples (azúcares, aminoácidos y péptidos) por la acción de enzimas secretadas por los microorganismos como amilasas, lipasas y proteasas [81]. El siguiente paso es la acidogénesis en la que los productos que predominan son los ácidos grasos volátiles (AGV) [82], subsecuentemente los ácidos son metabolizados para obtener productos como $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COOH}$, H_2 y CO_2 sustratos directos para la formación del metano [83]. De acuerdo con las diferentes proporciones de microorganismos la acidogénesis puede ser clasificada en tres tipos [84]:

- 1) Fermentación Butírica que produce ácido butírico, ácido acético con H_2 y CO_2
- 2) Fermentación Propiónica en la que se produce principalmente ácido propiónico, ácido acético y ácido valérico con cantidades insignificantes de H_2 y CO_2 .
- 3) Fermentación de etanol en la que los componentes mayoritarios son etanol, ácido acético y pequeñas cantidades de H_2 y CO_2

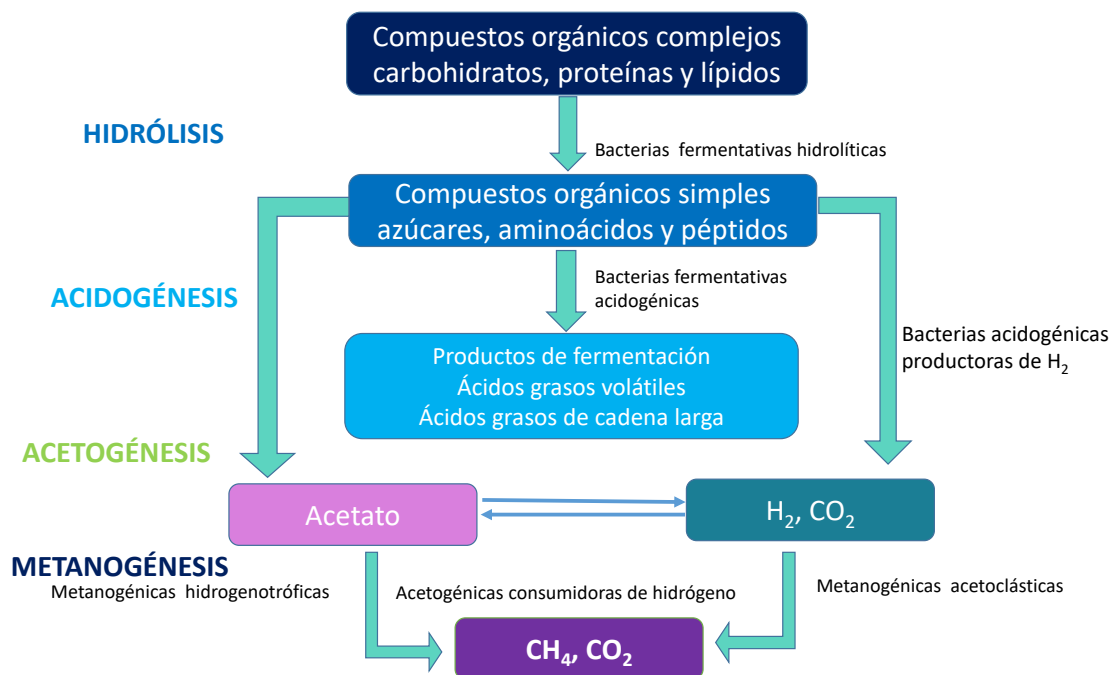


Figura 3.5 Etapas de la digestión anaerobia

La Figura 3.6 ilustra la ruta bioquímica de la fermentación oscura para la producción de hidrógeno. Los microorganismos anaerobios estrictos convierten el piruvato a Acetil coenzima A (acetil-CoA) y CO_2 mediante la piruvato ferredoxin oxidoreductasa (PFOR). Este proceso de oxidación requiere la reducción de la ferredoxina (Fd). Las reacciones de reducción de protones (H^+) facilitan la producción de H_2 , la interconversión de metabolitos toma lugar durante la degradación de sustratos. Los H^+ que provienen de los mediadores redox (NADH y FADH) se liberan en presencia de la enzima NADH-deshidrogenasa y son reducidos a H_2 en presencia la enzima hidrogenasa con la ayuda de los e^- donados por el cofactor ferredoxin oxidasa, mientras que los complejos protéicos (NADH deshidrogenasa y citocromo bc-1) ligados a la membrana y las proteínas transportadoras (ubiquinona y citocromo C) facilitan la transferencia de electrones a través del depósito de ubiquinona (Q pool). La interconversión continua de Q (ubiquinona) y H^+ del citosol a QH_2 (ubiquinol) y de QH_2 a Q y H^+ facilitan la transferencia de electrones al complejo citocromo b-c1 (Cyt bc1) y después al citocromo aa3. Finalmente, los e^- del citocromo aa3 son transferidos al Fe de la Fd. Esta ferredoxina reducida dona e^- al sitio activo de la enzima hidrogenasa la cual usa estos electrones para reducir H^+ y producir H_2 [65].

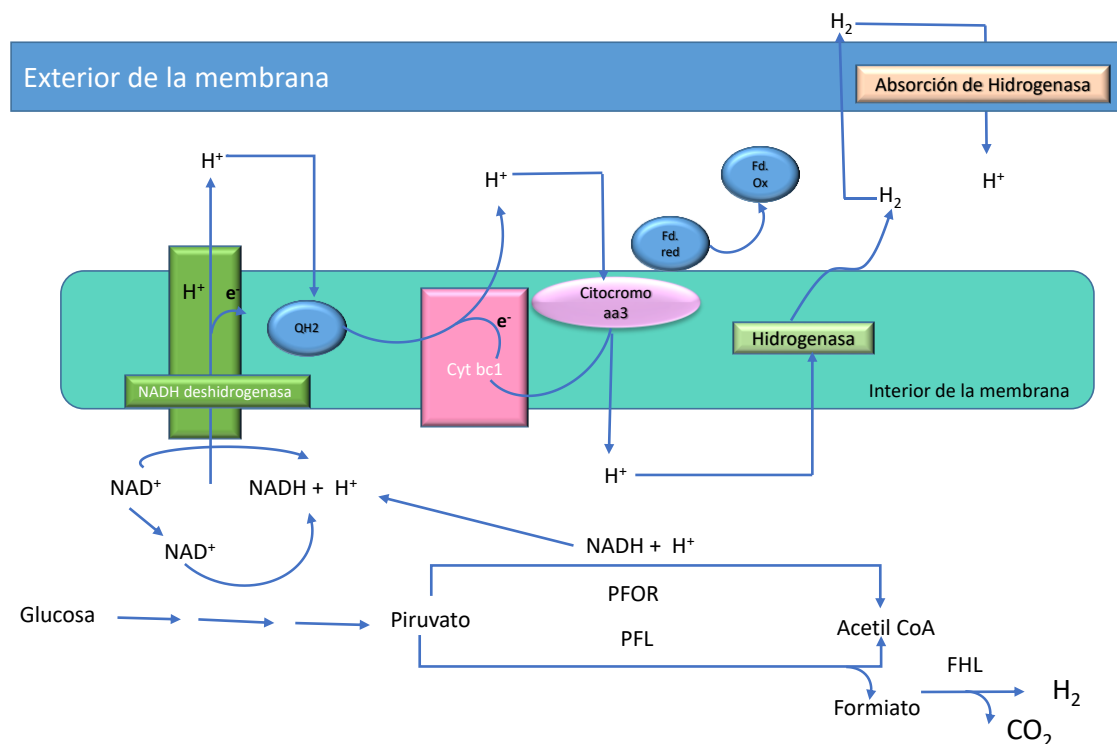


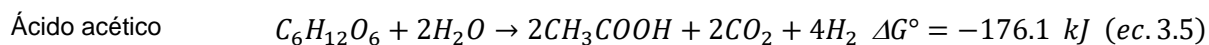
Figura 3.6 Esquema del mecanismo para la conversión de sustratos a H_2 vía fermentación oscura

La FO debería producir hasta 12 mol de H_2 por mol de glucosa [31,73], sin embargo, la termodinámica determina que el máximo rendimiento teórico reportado para este proceso es de 4 mol de $H_2 \cdot mol^{-1}$ de glucosa [78, 85].

Entre las ventajas que presenta sobre otros bio-procesos destacan la alta tasa de crecimiento celular, que no requiere luz, el O_2 no representa una limitante y tiene el potencial de utilizar diversos sustratos simples, así como complejos [86].

3.5.1 Productos y subproductos de la FO

Durante la fermentación anaerobia se siguen diversas rutas dependiendo de las condiciones de operación del proceso. El piruvato entra a la ruta acidogénica y produce AGVs como ácido acético, ácido propiónico, ácido butírico (ecuaciones 3.5-3.8) [65, 78]. Mientras que la homoacetogénesis es una ruta que consume H_2 durante la fermentación (Ec. 3.9) [87].



Ácido butírico	$C_6H_{12}O_6 \rightarrow CH_3CH_2CH_2COOH + 2CO_2 + 2H_2 \quad \Delta G^\circ = -247.7 \text{ kJ (Ec. 3.6)}$
Ácido propiónico	$C_6H_{12}O_6 + 2H_2 \rightarrow 2CH_3CH_2COOH + 2H_2O \quad \Delta G^\circ = -322.5 \text{ kJ (Ec. 3.7)}$
Etanol	$C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2CH_3CH_2OH + 2CO_2 \quad \Delta G^\circ = -219.6 \text{ kJ (Ec. 3.8)}$
Homoacetogénesis	$2CO_2 + 4H_2 \rightarrow CH_3COOH + 2H_2O \quad \Delta G^\circ = -75.7 \text{ kJ (Ec. 3.9)}$

3.5.2 Microorganismos de la FO

Los microorganismos de la fermentación oscura pueden clasificarse en base a su sensibilidad al oxígeno y a los requerimientos de temperatura. Los microorganismos que requieren condiciones estrictamente anaerobias son llamados anaerobios obligados, los que pueden subsistir en ambos ambientes (aerobio y anaerobio) son llamados anaerobios facultativos; basados en requerimientos de temperatura se encuentran los mesófilos en condiciones de temperatura ambiente y termófilos los que se adaptan a altas temperaturas [52].

La producción de H_2 se puede dar por el uso de cultivos puros o mixtos (con bacterias acidogénicas y acetogénicas), siendo preferidos los cultivos mixtos ya que no requieren condiciones estériles y pueden generar una actividad sinérgica entre los microorganismos [88].

Debido a la madurez de la tecnología de lodos activados y digestión anaerobia para el tratamiento de aguas residuales, se ha dado impulso a la producción de hidrógeno por fermentación oscura. Uno de los enfoques principales de la investigación en producción de hidrógeno por fermentación oscura es identificar que microorganismos son los productores de H_2 [89].

Los productos formados durante las etapas de la FO también dependen del tipo de microorganismo presente. Para la producción de H_2 existen un gran número de bacterias anaerobias facultativas [82] como *Escherichia coli*, *Enterobacter*, *Citobacter* [30] o anaerobias estrictas como el *Clostridium acetobutylicum* [63] que ha sido ampliamente estudiada y es responsable de la mayor producción de ácido pirúvico en la fermentación [30].

Las especies de *Clostridium* son altamente utilizadas debido a sus altos rendimientos en la producción de hidrógeno, son bacterias gram positivas, anaerobias estrictas y formadoras de esporas. Los miembros de la familia *Enterobacteriaceae* son conocidos por sus altos rendimientos y altas tasas de producción de hidrógeno, son organismos facultativos por lo que son fáciles de trabajar en los reactores; además de que poseen las enzimas [Fe-Fe]-hidrogenasa o Formato hidrogeno liasa (FHL), las cuales son responsables de las altas producciones [52].

En un estudio para la identificación de microorganismos participantes en la producción de H_2 a partir de glicerol, se lograron identificar: *Enterobacter ludwigii*, *Shigella sonnei*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Staphylococcus warneri*, *Alcaligenes faecalis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus atrophaeus*, y *Citrobacter freundii*. Los *Bacillus amyloliquefaciens* mostraron el rendimiento más alto en la producción de biohidrógeno con valores de 0.50 ± 0.20 mol H_2 /mol de glicerol [90].

La producción comercial de H_2 por procesos biológicos no se encuentra reportada debido a que aún prevalecen los desafíos para escalar esas tecnologías [63], es decir que a pesar de que este proceso posee muchos méritos como reducir la contaminación ambiental, disminuir costos de disposición de residuos ya que los usa como sustratos lo que la hace económicamente viable, esta tecnología aún requiere ser mejorada para su comercialización [1].

3.5.3 Factores ambientales importantes en la producción de biohidrógeno vía FO.

Existen diversos factores que son clave ya que determinan la producción biológica de hidrógeno como: temperatura, pH, tiempo de retención hidráulico, presión parcial del hidrógeno, tipo de inóculo, concentración del sustrato y nutrientes [30, 91].

3.5.3.1 Temperatura:

La fermentación oscura puede efectuarse a diferentes temperaturas: mesofílica (25- 40°C), termofílica (65-80°C), o hipertermofílica (>80°C).

Este factor afecta la tasa de crecimiento de los microorganismos, así como la tasa de conversión del sustrato durante la producción de H_2 [74]. La temperatura puede modificar las rutas metabólicas a medida que cambia la predominancia de los microorganismos a diferentes temperaturas [77], valores altos de temperatura en la operación de los reactores favorecen el desempeño de los reactores al limitar la actividad de las consumidoras de hidrógeno, favorecen la hidrólisis del sustrato y disminuyen la solubilidad del H_2 en el medio líquido [31].

3.5.3.2 pH:

Es uno de los principales factores a considerar en la producción de hidrógeno, debido a sus efectos sobre las rutas metabólicas y por consecuencia el rendimiento de la producción de H_2 . [92]. Todas las enzimas permanecen activas solamente a pH específicos, al pH óptimo muestran su mayor actividad, por lo tanto, este es un factor que afecta significativamente a la hidrogenasa, enzima clave en el proceso. La máxima producción de H_2 para residuos orgánicos de alimentos ocurre en el intervalo de 4.5 a 7 [30].

A pH menor a 5.0 la producción de H_2 se ve disminuida debido al aumento en la formación de metabolitos ácidos, los cuales disminuyen la capacidad celular de mantener el pH interno, lo que resulta en la disminución de los niveles de ATP y por lo tanto se inhibe la absorción de glucosa. A estos valores de pH se favorece la producción de solventes como etanol, propanol y butanol [22].

3.5.3.3 Tiempo de retención hidráulico (TRH)

El tiempo de fermentación se considera un factor clave en la selección de las poblaciones microbianas cuyas tasas de crecimiento pueden mantener la población para flujos continuos. Afecta la hidrólisis del sustrato y puede usarse como parámetro de control de la actividad metanogénica, debido a

las diferentes tasas de crecimiento de las bacterias productoras e inhibidoras de hidrógeno [30].

El tiempo de retención hidráulico (TRH) se define como el volumen del reactor/flujo volumétrico y es conocido también como el inverso de la tasa de dilución D [93]. La reducción del TRH es una estrategia potencial que incrementa el rendimiento de H_2 y selecciona las poblaciones de cultivos mixtos, además TRH cortos pueden inhibir la producción de metano en reactores de tipo agitado continuo [94].

3.5.3.4 Nutrientes:

Los suplementos de nitrógeno, fosfato, hierro y azufre en cantidades traza son esenciales para maximizar la producción de H_2 durante la FO [69]. Adicionalmente la relación C/N juega un papel importante en la estabilización del proceso de fermentación oscura ya que entre sus ventajas están el balance de nutrientes, el equilibrio en la relación C/N, y el incremento de la capacidad buffer del sistema [2]. Se ha demostrado que una baja concentración de nitrógeno, es decir alta relación C/N caracteriza a un sustrato con una pobre capacidad buffer y una alta posibilidad de acumulación de AGVs durante el proceso de codigestión [95], además bajo estas condiciones los microorganismos son incapaces de sintetizar enzimas para hidrolizar y fermentar el sustrato [96], por el contrario una baja relación C/N (alta concentración de nitrógeno) libera NH_3 que incrementa el pH, causa toxicidad debido a que puede pasar a través de la membrana celular y causar un desequilibrio de protones y una deficiencia de potasio [97].

3.5.3.5 Presión parcial de H_2

La presión parcial de H_2 en el espacio cabeza del reactor juega un rol importante en el desempeño de la producción de H_2 ya que puede determinar la concentración de H_2 disuelto en el líquido [31]. El H_2 y CO_2 producidos durante la FO generan sobresaturación en la fase líquida,

permitiendo la transferencia de las especies a la fase gaseosa [22]. Las rutas biológicas para la producción de H_2 son altamente sensibles a este factor debido a que la actividad de la hidrogenasa (que transfiere un electrón de la cadena transportadora intracelular al H^+) disminuye debido a un mecanismo de control celular llamado inhibición por retroalimentación, en el cual la actividad enzimática es inhibida por un producto final [66].

3.5.4 Reactores

La configuración del reactor biológico es crucial para la producción fermentativa de H_2 . En estudios recientes se ha investigado el potencial de la fermentación oscura en diferentes sistemas a escala laboratorio en modo batch ya sea continuos y semicontinuos, en los cuales la biomasa puede estar suspendida o inmovilizada. Los sistemas con biomasa estabilizada presentan la ventaja de retener un mayor tiempo la biomasa usando TRH cortos evitando de esta manera el lavado de la misma [98]. Los reactores batch o en lote se han usado con fines de investigación, al ser flexibles y sencillos de operar, sin embargo, la producción de H_2 a escala industrial requiere reactores de flujo continuo [99]. García-Peña y col reportaron que para la codigestión de cáscaras de piña con glucosa en un reactor de 1.5 L de volumen y concentración de 37 gCOD.L⁻¹ se produjo 1.7 mmol d⁻¹ BH₂, mientras que la baja producción de biohidrógeno fue con concentraciones entre 5 a 11 g COD.L⁻¹ [100]. Por otra parte, Prethi reportó la extracción de energía de agua residual de la industria cervecera con concentración de 2 gCOD.L⁻¹, obteniendo un rendimiento de 1.5 mol H_2 .mol Fructosa⁻¹ [101]. Bajo esta configuración, una vez consumido la materia orgánica en el reactor se debe vaciar el reactor y luego volver a cargar para continuar lo que resulta poco práctico.

Respecto a los reactores continuos tipo tanque agitado (CSTR Continuously stirred tank reactor), que consisten en tanques equipados con agitadores mecánicos, se requiere una agitación efectiva para que la mezcla sea homogénea y se proporcione un contacto adecuado entre microorganismos

y sustratos. No obstante, esta configuración presenta como desventaja el lavado de la biomasa celular debido a que la operación se realiza con TRH cortos [102], lo que limita la concentración de biomasa dentro del reactor, ocasionando inestabilidad y por consecuencia cambio en la producción de BH_2 . M. Tena publicó recientemente la codigestión de vinazas con lodos de planta de tratamiento en un reactor CSTR para un intervalo de TRH entre 0.25 a 5 días. La máxima producción de hidrógeno fue de $35 \text{ mLH}_2\text{.gSV}$ para HRT de 0.5 días mientras que para $\text{TRH} > 2$ días la producción fue $10 \text{ mLH}_2\text{.gSV}$ [103]. Este resultado confirmó la relación inversa entre el HRT y la producción de biohidrógeno que ha sido atribuida a esta configuración de reactor por varios autores [103,104]

Una alternativa para el reactor CSTR es el reactor empacado de flujo ascendente (UPBR upflow packed-bed reactor) en esta configuración la alimentación es por la parte inferior y la salida por la parte superior, la biomasa se inmoviliza en algún medio de empaque como carbón activado, arcilla expandida, esponja vegetal [105]. Comparado con el CSTR, el UPBR resulta en una menor conversión del sustrato y por ende una menor producción de H_2 [99].

El tipo de reactor anaerobio de flujo ascendente (UASB up-flow anaerobic sludge blanket), se emplea en pruebas a nivel laboratorio y en escala piloto para la producción de CH_4 y de H_2 [91]. Los reactores de lecho fijo presentan algunos problemas como la localización de las poblaciones diferentes a lo largo del reactor. Existen pocos reportes del uso del reactor UASB en codigestiones, debido probablemente a que se necesitan largos intervalos de tiempo para el arranque de este tipo de reactores, el tiempo es necesario para estabilizarlos y lograr la formación de gránulos [99].

Existen reportes de codigestiones de suero de queso con agua residual de la industria de la cerveza con TRH entre 12, 9 y 3 h y cargas orgánicas de $20 \text{ gCOD.L}^{-1}\text{.d}^{-1}$; para estos biorreactores reportaron 3.07, 2.18 y $0.93 \text{ mmol H}_2 \text{ g DQO}^{-1}$ de productividad en cada ciclo, con la ventaja que los reactores operaron de manera continua 30 ciclos [106]. Sin embargo, aún resulta prematuro orientar

la operación del reactor UASB hacia estándares de alta rendimiento y asegurar una disponibilidad confiable de energía porque existen deficiencias en el control de parámetros como pH, nitrógeno, alcalinidad además de conocer mejor la actividad microbiana.

Existen varios estudios que destacan los beneficios de usar un reactor UASB en la codigestión de residuos de frutas y lodos de planta de tratamiento [105-109], aguas residuales de rastro [110] o aguas residuales domésticas con efluente de la industria del biodiesel [111] para la producción de bio-hidrógeno. En primer lugar, diversos trabajos destacan el beneficio de operar el reactor UASB ya que puede operar con una alta carga orgánica ($<30 \text{ g.L}^{-1} \text{ DQO}$), destacando que el contenido de metano disminuye al aumentar la carga orgánica y disminuir el TRH, se hallan reportes de rendimientos de H_2 de hasta $3.76 \text{ mol H}_2 \cdot \text{mol}_{\text{sacarosa}}^{-1}$ [101]. Un factor determinante para aprovechar de manera efectiva los sustratos orgánicos ricos en carbohidratos, proteínas, iones metálicos y polisacárido complejos es la relación C/N.

Para superar la limitante del largo periodo del arranque del reactor, en este trabajo se propone un reactor de flujo ascendente, con la modificación de un soporte interno que consta de tres platos que permiten la distribución longitudinal del inóculo para garantizar su contacto con el influente a lo largo del reactor.

En la Tabla 3.3 se presenta un resumen con las características de los diferentes tipos de reactores [104], comentados en esta sección, que pueden ser empleados en la FO.

Tabla 3.3 Características de las diferentes configuraciones de reactores empleados en la fermentación oscura.

Tipo de reactor	Modo de Operación	Particularidad	Ventajas
Reactor en Lote (batch)	Lote	<ul style="list-style-type: none"> • Agitación mecánica. 	<ul style="list-style-type: none"> • Este tipo de configuración se utiliza de forma preliminar para seleccionar condiciones de operación de la Fermentación oscura.
Reactor Continuo tipo Tanque Agitado. CSTR	Continuo	<ul style="list-style-type: none"> • Agitación Mecánica • Facilidad de control de parámetros de operación y ajuste. • Mayor homogeneidad facilitando la dispersión del Inoculo en el sustrato. 	<ul style="list-style-type: none"> • La agitación continua favorece un control efectivo del pH y de la Temperatura. • La agitación continua mejora la eficacia de la separación del bioH₂ de mezcla del reactor, lo que ocasiona la disminución de la Presión Parcial del BioH₂ y aumenta el rendimiento del BioH₂. • La concentración de biomasa es limitada. • El reactor opera a TRH cortos.
Reactor Anaerobio de Flujo Ascendente. UASB	Continuo	<ul style="list-style-type: none"> • Tres fases presentes. • Alimentación en la parte inferior del reactor. • No requiere agitación mecánica porque las burbujas de gas producen turbulencia en el reactor. 	<ul style="list-style-type: none"> • El inoculo se encuentra en el fondo del biorreactor. • Producción de bioH₂ reproducible. • La FO opera durante varios meses formando gránulos. • Alta efectividad en la producción de bioH₂ opera a cortos TRH y condiciones estables.
Reactor anaerobio de Lecho Fluidizado	Continuo	<ul style="list-style-type: none"> • Combina características del reactor CSTR y del reactor de lecho inmovilizado. • El lecho fluidizado se genera con gas inerte desde el fondo del reactor. 	<ul style="list-style-type: none"> • Los microorganismos se depositan en una superficie como gránulos o biopelículas. • Baja probabilidad de lavado de biomasa. • Adecuada transferencia de masa y de energía.

3.6 Codigestión, antecedentes de la investigación

Si bien la investigación de la FO inició estudiando sustratos puros con alto contenido de carbohidratos, como glucosa, sacarosa y almidón, su uso no resulta rentable a escala industrial debido al alto costo que implica. Las alternativas sugieren el uso de diferentes residuos que cumplan características de ser ricos en carbohidratos, económicos, de alta disponibilidad y fáciles de fermentar. Esta última característica es muy importante; sin embargo, por la naturaleza compleja de algunos residuos no siempre se cumple. Para superar esta limitante la estrategia es combinar dos o más tipos de residuos que se complementen y faciliten el proceso, esta estrategia es conocida como codigestión.

La codigestión anaerobia muestra mejor eficiencia que el proceso de monodigestión ya que ofrece beneficios complementarios como mejor rendimiento, disponibilidad de nutrientes, variabilidad del sustrato y dilución de compuestos tóxicos, sin embargo, aún presenta grandes desafíos [112].

Actualmente en algunas regiones del mundo se han usado bioresiduos como fuente en procesos de codigestión anaerobia para la producción de BH_2 . El resultado de la codigestión de suero de leche-vegetales, utilizando una relación $\text{C/N}=21$, alcanzó un rendimiento de $450 \text{ mL H}_2 \text{ g}_{\text{DQO}}^{-1}$ [113]. En otro estudio García Depraect y col. realizaron la codigestión de vinazas–*nejayote* en la que el rendimiento alcanzado fue de $115 \text{ mL H}_2 \text{ g STV}^{-1}$ empleando una relación vinaza/*nejayote* 80/20 [114], ambos estudios fueron realizados en México. En Túnez Saidy y col., utilizaron frutas/vegetales con residuos de pescado, la codigestión fue llevada a cabo a una temperatura hipertermofílica (80°C), para la relación $\text{C/N}=22$; el máximo rendimiento obtenido fue de $3.86 \text{ mol H}_2 \text{ mol hexosa}^{-1}$ [107]. Una codigestión de residuos de café-azúcar de caña-vinazas fue estudiada por Maciel Pinto y col en Brasil, iniciaron el estudio en condiciones acidogénicas (pH de 5-6.5), obteniendo una composición de BH_2 de 31.5 % [115], en Italia se evaluó la codigestión de suero de queso-mantequilla por Pagliano y col. para evaluar los cambios en la composición microbiana que

participó en el proceso, determinaron que *Methanoculleus*, *Methanocorpusculum* y *Methanobrevibacter* fueron las arqueas dominantes del proceso [116].

Las publicaciones más recientes proponen el uso de residuos de frutas como sustratos, al ser ricos en carbohidratos, los cuales proporcionan balance nutricional con otros sustratos ricos en polisacáridos y proteínas [108, 117] que propician un ambiente adecuado para la proliferación la microflora productora de BH_2 [118, 119]. Saidi y col. replicaron la producción de BH_2 ($28 \text{ mmol h}^{-1} \text{ L}^{-1}$) en un reactor batch utilizando *Thermotoga maritima* con una relación C/N de 22, lo cual representa un incremento de tres veces lo obtenido por la codigestión de frutas-vegetales-residuos de pescado [107]. Por otra parte, Gómez-Romero demostró que la adaptación de comunidades microbianas predominante de *Bifidobacterium* fue de 85.4%, seguida por *Klebsiella* (9.1%), *Lactobacillus* (0.97%), *Citrobacter* (0.21%), *Enterobacter* (0.27%) y *Clostridium* (0.18%) en un reactor alimentado con suero de leche y residuos de frutas a diferentes relaciones de C/N ($5 < \text{C/N} < 46$). La velocidad específica más alta de producción de H_2 fue $10.68 \text{ mmol h}^{-1} \text{ L}^{-1}$ para una relación C/N de 21 [113]. De igual forma Bikram estudió la codigestión de frutas y vegetales mezclados con suero de queso, en el que obtuvo una productividad máxima de H_2 de $118.12 \pm 1.05 \text{ mmol L}^{-1}$ con una relación C/N de 68 [120]. En contraste con los resultados reportados por Gómez-Romero, las especies predominantes fueron *Escherichia coli*, *Clostridium butyricum* y *Streptococcus henryi*.

Gómez Romero describió el uso de diferentes residuos municipales o industriales como sustratos en la FO [113]. Los resultados obtenidos en este estudio mostraron que la producción de BH_2 puede ser reducida e incluso inhibida por algunas características específicas de los residuos orgánicos presentes en las aguas residuales como la deficiencia en la capacidad buffer, mal balance de nutrientes y la presencia de microorganismos que pueden consumir BH_2 o producir CH_4 . La estrategia para vencer este problema es utilizar los procesos de codigestión debido a los efectos sinérgicos positivos por la mezcla de los sustratos, complementado con la optimización de las condiciones para la

producción de BH_2 : control de pH, optimización de la relación C/N. De hecho, la relación C/N (20-40) se usa como parámetro de referencia asociado al aumento de la capacidad buffer del sistema [113,117, 120,121].

En el caso de la codigestión anaerobia Rabii y col, mencionan que esta relación en conjunto con otros factores debe satisfacer las necesidades del proceso, se plantea que una relación adecuada para los procesos metabólicos se encuentra en el intervalo de C/N 20-30, ya que es suficiente para mantener la estabilidad del sistema, además para cumplirla, los sustratos con relaciones C/N >50, pueden ser codigeridos con otros sustratos que tengan una relación C/N menor [122].

El tiempo de retención hidráulico es otro parámetro importante de la operación continua (> 50 días), señalando intervalos cortos de TRH como los más selectivos a BH_2 ($\approx 65\%$). Jyotsana Prakash y col. realizaron una comparación del desempeño de la codigestión de residuos de frutas con residuos de biodiésel entre un RB (2.0 L) y un UASB utilizando dos cultivos (*Bacillus thuringiensis* y *Bacillus amyloliquefaciens*) dentro del intervalo de concentraciones de 0.1 a 10%. La primera bacteria fue más selectiva hacia BH_2 (56 a 70%) generando una productividad de 70 a 100 $\text{L H}_2 \text{ L}^{-1}$ glicerol en el RB. Sin embargo, cuando el sistema operó de forma continua durante 120 días la bacteria *Bacillus amyloliquefaciens* produjo 120 $\text{L H}_2 \text{ L}^{-1}$ Glicerol [111].

En países en desarrollo los residuos municipales comprenden en su mayoría residuos de frutas y vegetales de acuerdo con lo reportado en literatura [53, 123]. En la ZMM, se generaron aproximadamente 800 mil toneladas de residuos orgánicos en el 2017 [55]. Esta cantidad de biomasa que contiene un alto contenido de carbohidratos hidrolizables fue el criterio para la selección de las cáscaras de frutas como sustratos, para la producción de biocombustibles en combinación con los lodos generados a partir de procesos biológicos. Generalmente, los lodos son tratados por procesos de digestión anaerobia para la producción de metano, sin embargo, el BH_2 es un subproducto de importancia en este proceso. De ahí que ambos residuos pueden ser apropiadamente

procesados y valorizados en un proceso de fermentación oscura, debido a que son abundantes y sin costo. Sin embargo, una vez que estas tecnologías sean viables, seguramente habrá un costo implicado en la logística de recolección y transporte. Con base en lo anterior este estudio describe la codigestión de cáscaras de frutas con lodos residuales provenientes de una planta de tratamiento de agua municipal en un reactor anaerobio.

CAPÍTULO IV

MATERIALES Y MÉTODOS

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Metodología General

En este capítulo se presentan el desarrollo experimental realizado en el Laboratorio de Ingeniería Ambiental de la Facultad de Ingeniería Civil de la Universidad Autónoma de Nuevo León. Financiado por la Secretaría de Energía y el Consejo Nacional de Ciencias y Tecnología a través del proyecto 249908.

Los sustratos empleados en este estudio fueron cáscaras de frutas CFs, provenientes de un establecimiento de venta de jugos y licuados ubicado en San Nicolás de los Garza, N.L. y lodos primarios (LP) provenientes de la PTAR Norte ubicada en Escobedo, N.L.

La metodología general seguida para el desarrollo de este proyecto se muestra en el diagrama de la figura 4.1.

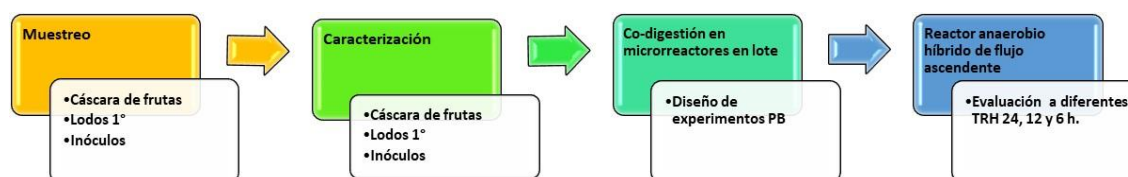


Figura 4.1 Diagrama general de la metodología implementada para el proyecto sobre la producción de H_2 .

4.2 Obtención de sustratos e inóculos

Para el proceso de FO se seleccionaron sustratos reales en la ZMM. A partir del análisis de literatura se identificó que no hay muchos reportes de la codigestión de los siguientes sustratos: CFs específicamente melón (*Cucumis sp.*), papaya (*Papaya sp.*) y piña (*Ananás sp.*), obtenidas de un restaurante vegetariano de la localidad (correspondientes a los de mayor proporción presente en la muestra); y un lodo primario (LP) proveniente de una planta de tratamiento de agua residual municipal en la ciudad de Monterrey.

4.2.1 Muestreo de los residuos de frutas (CFs)

Se colectaron las muestras de CFs en bolsas de polietileno, una vez colectada suficiente cantidad de muestra se procedió a colocarla en una mesa para extenderla, separarla y seleccionar los sustratos para el experimento, de acuerdo a la NMX-AA-015-1985 correspondiente a residuos sólidos municipales- Muestreo-Método de cuarteo [124]. Los residuos se molieron usando una licuadora industrial (Waring Laboratory Sience, modelo BLENDOR), para homogeneizarlos, el proceso de molienda se realizó sin la adición de agua, luego se tamizaron a través de una malla #10 (<2 mm) y finalmente se almacenaron a 4° C hasta su uso como sustrato rico en carbohidratos en las codigestiones diseñadas en este trabajo.

4.2.2 Muestreo de lodos

El muestreo de los lodos se realizó de acuerdo a la norma PROY-NMX-AA-003/3-SCFI-2008 de aguas residuales [125], específicamente en el punto marcado en el esquema de la Figura 4.2. La muestra se colectó en un recipiente de 20 L, y se mantuvo a temperatura de 4 °C hasta su uso, el LP colectado se hizo pasar a través de un tamiz de malla #10 para usarlo como uno de los componentes con alto contenido de nitrógeno en las diferentes codigestiones diseñadas a lo largo del estudio.



Figura 4.2 Esquema de la planta tratadora de aguas residuales municipales por lodos activados. Punto de muestreo de lodos primarios

4.2.3 Inóculo

Para la producción de BH_2 se utilizaron dos fuentes de inóculo: el primero proveniente de lodos anaerobios (LA) obtenidos de la planta de tratamiento de agua residual de Servicios de agua y Drenaje de Monterrey (SADM). El segundo inóculo fue un lodo anaerobio granular (LAG) que se recuperó de la planta tratadora de efluentes, de una industria de bebidas de la localidad.

Cada inóculo fue tratado por separado en baño María a 90°C por 30 minutos y posteriormente enfriado antes de ser empleado en la FO. El inóculo fue utilizado en proporción del 10% p/v. La solución nutritiva utilizada para el crecimiento de las bacterias productoras de hidrógeno fue una mezcla de macro y micronutrientes [91], con la composición (g/L): NH_4Cl (PQM) (0.5), K_2HPO_4 (PQM)(0.25), $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0.3) (Sigma Aldrich), KH_2PO_4 (0.25), FeCl_3 (Sigma Aldrich) (0.025), $\text{CoCl}_6 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (J.T. Baker) (0.025), NiSO_4 (0.016) (J.T. Baker).

4.3 Caracterización de sustratos

Los métodos analíticos utilizados para la caracterización de los sustratos se enlistan en la Tabla 4.1 y se describen en los puntos posteriores. Para la caracterización de los residuos de frutas fue necesario moler los residuos en una licuadora industrial (*Waring Laboratory Sience, modelo BLENDOR*) para homogeneizarlos, el proceso de molienda se realizó sin la adición de agua.

NOTA: En el Anexo 1 se describen a detalle los procedimientos empleados para la caracterización de sustratos antes y durante la reacción de codigestión de CFs y LP.

4Tabla 4.1 Parámetros de caracterización de residuos de alimentos y lodos

Parámetros	Métodos	Referencias
pH	Standard Methods for Test Water and Wastewater	126
Sólidos y sales disueltas	NMX-AA-034-SCFI-2001	127
Demanda Química de Oxígeno (DQO)	NMX-AA-030/2-SCFI-2012	128
Nitrógeno	NMX-AA-026-SCFI-2001	129
Carbohidratos	Dubois	130
Proteínas	Lowry	131

4.4 Codigestión Anaerobia en biorreactores en lote

4.4.1 Preparación de biorreactores en lote

Para la evaluación de la productividad del proceso de codigestión en la producción de hidrógeno en biorreactores en lote (Figura 4.3), se utilizó un diseño de experimentos de tipo Plackett-Burman de tres factores, en el cual se evaluaron tres temperaturas de digestión: 25, 37 y 55°C., Las relaciones C/N empleadas fueron: 20, 30 y 40; las cuales fueron obtenidas al mezclar diferentes proporciones de CFs y LP, y el tercer factor evaluado fue la fuente de inóculo, se evaluaron dos fuentes: LA, LAG .

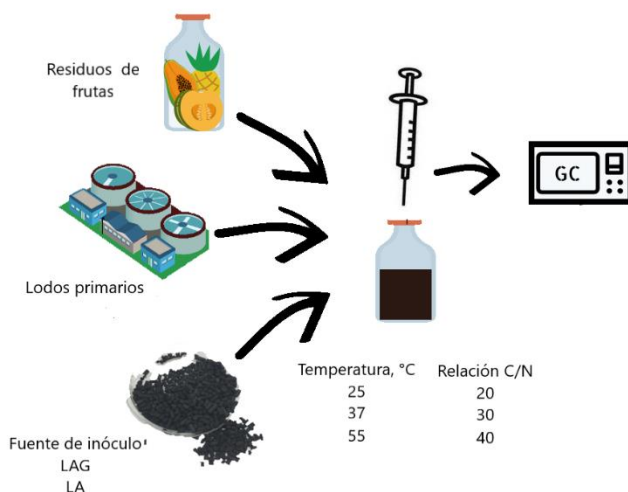


Figura 4.3 Diagrama del proceso de codigestión en reactores en lote

A partir de la matriz de experimentos (Tabla 4.2) se prepararon 18 biorreactores en lote (con 4 réplicas) usando viales de 124 mL, con un volumen de trabajo de 80 mL. Enseguida se incorporó en cada preparación 10% P/V de inóculo (LA o LAG). La solución nutritiva utilizada para el crecimiento de las bacterias productoras de BH₂ fue una mezcla de macro y micronutrientes, se adicionaron a cada biorreactor 10 mL de esta mezcla [91], con la composición (g/L): NH₄Cl (PQM) (0.5), K₂HPO₄ (PQM)(0.25), MgCl₂·6H₂O (0.3) (Sigma Aldrich), KH₂PO₄ (0.25), FeCl₃ (Sigma Aldrich) (0.025), CoCl₆·H₂O(J.T. Baker) (0.025), NiSO₄ (0.016) (J.T. Baker). El pH inicial de las mezclas se ajustó a 5.5 con H₂SO₄ 0.1 N. Durante el montaje de los biorreactores, éstos fueron purgados con nitrógeno para proporcionar las condiciones anaerobias y después sellados con septas de goma y anillos de aluminio. Se pusieron en incubación a las diferentes condiciones indicadas en la Tabla 4.2 utilizando las incubadoras MaxQ™ 6000X.

Tabla 4.2 Matriz de diseño de experimentos Packett–Burman

Reactor	Relación C/N	Temperatura °C	Fuente Inóculo
1	20	55	LA
2	30	37	LA
3	20	25	LA
4	40	25	LA
5	40	55	LAG
6	30	37	LAG
7	20	55	LAG
8	20	55	LAG
9	40	25	LAG
10	20	25	LA
11	40	25	LA
12	20	55	LA
13	20	25	LAG
14	30	37	LAG
15	40	55	LA
16	30	37	LAG
17	30	37	LA
18	30	37	LA

LA: Lodo Anaerobio; LAG: Lodo Anaerobio Granular

4.4.2 Monitoreo de los reactores

Para el seguimiento de los biorreactores preparados en la codigestión de CFs y de LP en el proceso de FO, se utilizaron las mismas técnicas fisicoquímicas descritas en la sección de 4.3. Para medir la evolución del pH, Carbohidratos Totales, DQO y SV, se sacrificó una réplica de cada una de las diferentes preparaciones en cada punto y conocer el avance de la reacción. Se determinó también el porcentaje de etanol en las muestras, fue medido con un refractómetro digital (Wago, modelo PET109).

4.4.3 Producción de Biogás (volumen y composición) y AGVs

La producción de biogás del conjunto de microrreactores preparados para la FO, fue cuantificado por el método de desplazamiento del émbolo, utilizando jeringas de 10-50 mL [133].

El análisis de la composición del biogás generado durante la codigestión, se realizó en un cromatógrafo de gases (CG) marca Agilent Technologies® modelo 7820 A, equipado con dos detectores. El primer analizador es un detector de conductividad térmica (TCD por sus siglas en inglés) y el segundo es un detector de ionización de flama (FID por sus siglas en inglés). Los gases permanentes se analizarán por TCD en una columna HP-MOLESIEVE, empleando Argón como gas de acarreo, temperatura del horno de 40 °C, temperatura del inyector de 180 °C y temperatura del analizador de 180 °C.

Los subproductos líquidos (AGVs) se analizaron con el detector FID en una columna HP-INOWAX, empleando Argón como gas de transporte. Para el horno se implementó una rampa de calentamiento de 70 °C a 180 °C con una velocidad de calentamiento de 10 °C·min.⁻¹, temperatura del inyector a 250 °C y temperatura del analizador a 250 °C.

Se realizaron las curvas de calibración en cromatografía de gases para el análisis de gases permanentes. utilizando un estándar de INFRA® con mezclas de gases como H₂, CH₄, CO y CO₂. En el caso de los AGVs, para realizar las curvas de

calibración se utilizó un estándar de Sigma Aldrich® con ácidos orgánicos como: ácido fórmico, acético, butírico, propiónico y valérico.

4.4.4 Análisis cinético de la producción de BH₂

Los resultados de producción acumulativa de BH₂ obtenidos en este ensayo fueron ajustados con la ecuación modificada de Gompertz [133].

$$H = H_{max} \exp \left\{ -\exp \left[\frac{R_m \cdot e}{H_{max}} (\lambda - t) + 1 \right] \right\} \quad Ec. 4.7$$

Donde H representa el volumen acumulativo de H₂ producido (mL·L⁻¹), H_{max} el potencial de producción de H₂ (mL·L⁻¹), R_m la velocidad de producción (mL·h⁻¹), λ la fase de latencia (h), t el tiempo de incubación (h), e la constante de Euler (2.718).

Los valores de H_{max}, R_m y λ se obtuvieron mediante un ajuste de mínimos cuadrados usando la función Solver de Excel (Microsoft 2010)

4.5 Operación del reactor anaerobio híbrido de flujo ascendente (RAHFA) de 1.4 L

4.5.1 Diseño y operación del proceso

Para evaluar la producción de BH₂ y el desempeño del reactor continuo RAHFA, en la codigestión anaerobia de residuos orgánicos, se utilizaron las condiciones experimentales en las que se obtuvo el mejor resultado durante la evaluación de los biorreactores en lote. Las condiciones son: relación C/N 30, la temperatura de 37 °C (la temperatura se mantuvo utilizando una chaqueta térmica) y como inóculo el LAG. En la Figura 4.4 se presenta un esquema del sistema experimental construido en el Laboratorio de Ingeniería Ambiental de la Facultad de Ingeniería Civil.

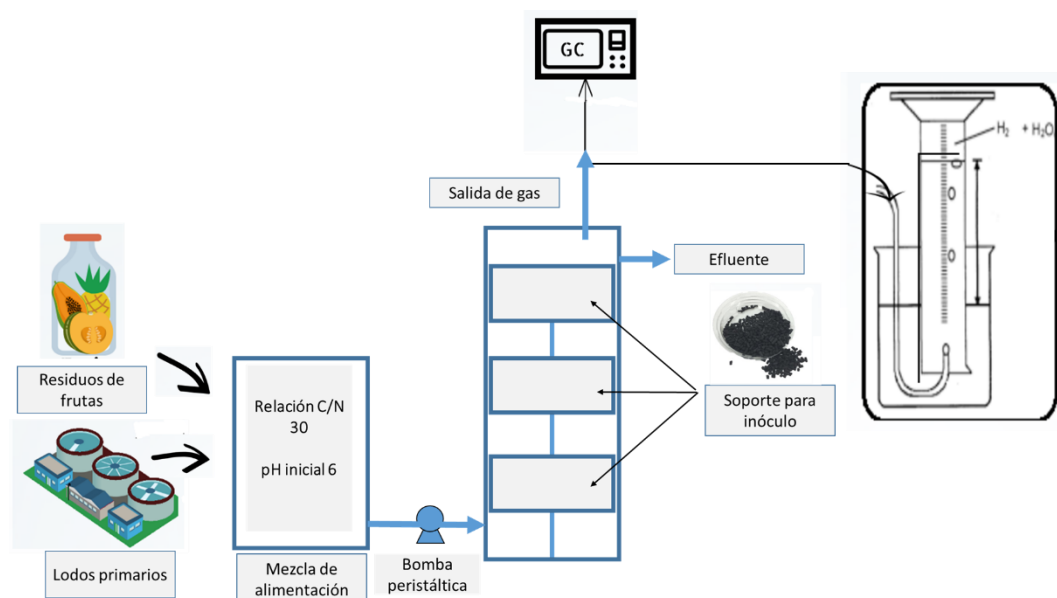


Figura 4.4 Reactor anaerobio híbrido de flujo ascendente para la codigestión de CFs con LP

El reactor se construyó con un cilindro de acrílico con las siguientes características: 1.6 L de volumen total y 1.4 L como volumen de trabajo (90 diámetro mm x 300 mm altura) y un espacio de cabeza 0.2 L. Al interior del reactor se colocó un soporte fabricado del mismo material que el reactor, en donde se distribuyó el inóculo (al 10% p/v) en tres platos (70 mm diámetro x 30 mm altura) con el fin de garantizar la distribución longitudinal del inóculo. El reactor se alimentó por la parte inferior empleando una bomba peristáltica de flujo variable DAIGGER y por la parte superior se colocaron dos salidas, una para el biogás y otra para el efluente. Las características de la mezcla de alimentación fueron $\text{pH} = 6.0 \pm 0.02$ (NaOH), relación C/N=30, DQO = 9 g/L, $[\text{CHT}] = 5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ y temperatura de $37 \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

Al iniciar el proceso el inóculo se aclimató por 30 días, posteriormente se operó el reactor a diferentes tiempos de retención hidráulico de 24, 12 y 6 h. Estos TRH se evaluaron en 10 ciclos, es importante mencionar que el reactor se mantuvo en operación durante 60 días con el fin de evaluar la producción de hidrógeno tiempo durante el cual no se mantuvo el control de pH.

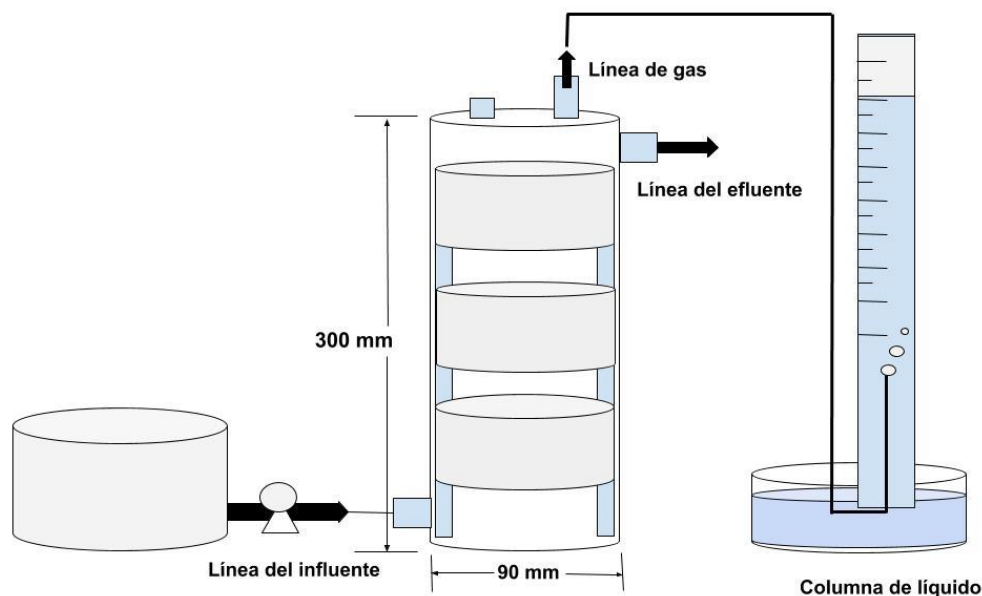


Figura 4.5. Esquema del reactor anaerobio híbrido de flujo ascendente con soporte para inóculo.

El biogás fue cuantificado por el método de desplazamiento de la columna de líquido [134], como se muestra en la Figura 4.5, y analizado por cromatografía de gases mientras que la parte líquida se colectó para la caracterización fisicoquímica.

4.5.2 Caracterización de la Cogestión a los Diferentes TRH

Para el seguimiento de la reacción de la mezcla de la codigestión anaerobia (CFs y LP) durante el proceso de fermentación oscura a los diferentes TRH: 24, 12 y 6 h. El efluente del reactor se monitoreó a la mitad de cada ciclo, y se procedió a caracterizar utilizando las técnicas para STV, de Espectroscopía UV-Vis para la determinación de la DQO, CHT, así como cromatografía de gases para los gases permanentes (H_2 , CO_2 , CH_4) y los ácidos grasos (ácido acético, ácido propiónico, ácido butírico, entre otros). La descripción experimental de las técnicas fue la misma que se describe en la sección 4.3.

4.5.3 Diversidad microbiana

Como parte del objetivo de determinar el análisis microbiológico de las especies presentes en el RAHFA, se realizó la extracción de ácidos nucleicos de los TRH (24, 12 y 6 h). Se partió de 0.25 g de muestra, se realizó la extracción con el kit DNeasy PowerSoil de QIAGEN, que consiste en realizar la lisis celular por métodos mecánicos y químicos. Durante la lisis celular se procede a la destrucción de las estructuras formadas por lípidos y proteínas permitiendo la liberación de ácidos nucleicos del núcleo celular. En presencia de ciertas sales los ácidos nucleicos quedan unidos por adsorción, el ADN genómico es capturado en una membrana de sílica colocada en una columna de centrifugado. Posteriormente el ADN se lava y finalmente se eluye de la membrana [135]. El procedimiento se ilustra en Figura 4.6

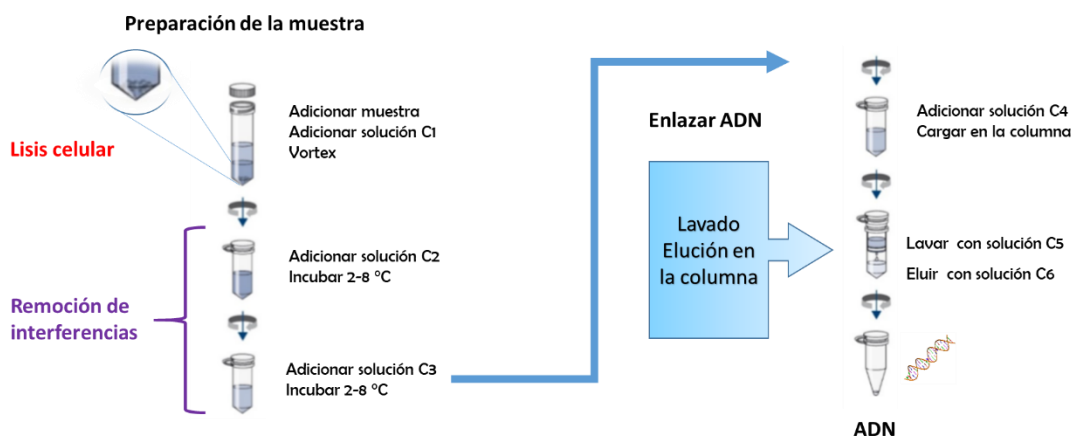


Figura 4.6 Procedimiento de extracción de ácidos nucleicos

Secuenciación

Para la identificación de las especies presentes en el inóculo y en el reactor a los diferentes TRH, se analizaron las muestras por secuenciación de amplicones (amplicon sequencing), técnica avanzada de secuenciación de productos de PCR del gen ARNr 16S, usando la plataforma MiSeq (Illumina), el estudio fue realizado por el laboratorio RTL Genomics, Lubbock, Texas. El software utilizado para realizar la evaluación de quimeras y ruido de fondo fue UCHIME y el agrupamiento en unidades taxonómicas operativas (OTUs) fue realizada mediante el algoritmo USEARCH.

CAPÍTULO V

RESULTADOS Y DISCUSIONES

5. RESULTADOS Y DISCUSIONES

5.1 Caracterización fisicoquímica de sustratos

Las características físicas y químicas de las CFs son importantes para el diseño y la operación de los digestores anaerobios, debido a que tienen efecto en la producción de biogás y la estabilidad del proceso de la FO. En la Tabla 5.1 se presentan los resultados de la caracterización fisicoquímica de las CFs y del LP. Ambos sustratos revelaron un alto contenido de humedad (en un intervalo de 87.45(1.9) % al 92.43(0.03)% lo que facilita el proceso de degradación [136] y la producción fermentativa de H_2 [107]. De los resultados también se puede observar que el contenido de SV oscila entre 56 y 88% del contenido de sólidos para el LP y las CFs respectivamente. El contenido de SV se puede interpretar como una medida indirecta del contenido de materia orgánica del sustrato que puede ser fácilmente biodegradada en el proceso de fermentación. Se observó que los LP tienen un menor contenido de SV, es decir que el 46% del contenido de sólidos no es materia orgánica, de ahí la dificultad para su biodegradación. Por lo tanto, la propuesta de mezclar estos sustratos en el proceso de codigestión, como se mencionó previamente es una estrategia para favorecer la fermentación de dicho sustrato.

El contenido de carbohidratos es un factor fundamental para la producción de H_2 ya que es durante las primeras etapas de la digestión anaerobia cuando este metabolito es producido [137] principalmente a partir de este tipo de compuestos [33, 138-140]. En este caso de estudio las CFs son las que aportan el mayor contenido de CHT al proceso de codigestión. En el caso del nitrógeno, el bajo contenido de este nutriente, presente en las CFs puede limitar la eficiencia del proceso de fermentación [107], por lo tanto, al utilizar las CFs en codigestión con el LP cuyo contenido de nitrógeno es mayor, se compensa esta deficiencia en el proceso. La relación C/N resulta importante ya que se ha demostrado que está relacionada estrechamente con la capacidad de producción de hidrógeno [141]. Además, se debe cuidar que el nitrógeno esté presente en la proporción adecuada ya que puede maximizar el crecimiento de la población microbiana, de

estar presente en exceso existe la posibilidad de causar inhibición por la producción de NH_3 [142].

Como se ha mencionado previamente, otro de los factores clave para la producción de BH_2 es el pH, aunque las CFs presentan pH menores, al usarlos en la mezcla de codigestion con los LP se podrá obtener mezclas con pH más cercanos a los reportados como adecuados (4.5-7.0 para la producción de H_2) al utilizar residuos orgánicos de alimentos como sustratos [30].

Tabla 5.1. Caracterización de sustratos.

Parámetro		Melón (<i>Cucumis melo</i>)	Papaya (<i>papaya spp</i>)	Piña (<i>Ananas spp.</i>)	Lodo primario
pH		5.95(0.15)	6.3(1.4)	4.18(0.12)	7.57(0.03)
Humedad	%	92.1(1.10)	89.61(1.3)	87.45(1.9)	92.43(0.03)
ST	%	7.51(1.10)	10.33(1.29)	12.55(1.92)	6.38(0.27)
SVT	%	6.54(0.95)	8.83(1.19)	11.5(1.86)	3.96(0.02)
Carbohidratos Totales	g 100 g _{sust} ⁻¹	10.4(0.24)	6 (0.14)	15(0.3)	0.45(.05)
DQO	g g _{sustrato} ⁻¹ mg·L ⁻¹	3.6(0.5) -	6.9(0.5) -	7.5(0.5) -	- 133.7(0.5)
Proteínas	mg kg _{sustrato} ⁻¹	3.7(0.18)	3.5(0.18)	1.8(0.18)	-
NTK	g·L ⁻¹	-	-	-	4.5(.06)

NTK Nitrógeno total Kjeldahl; (DS) Valores de desviación estándar

La caracterización de sustratos por tanto proporciona una idea del potencial que presentan los residuos mencionados para la producción de biogás y que pudieran actuar sinérgicamente al mezclar ambos residuos en el proceso de codigestión, en el cual las CFs contienen mayor cantidad de materia fácilmente biodegradable mientras que los LP proporcionan el nitrógeno que es un nutriente muy importante en el proceso.

5.2 Caracterización fisicoquímica de inóculos

Para el caso de los inóculos, se utilizaron dos fuentes diferentes durante la etapa de evaluación del potencial de producción de BH_2 en los reactores en lote. Ambos inóculos fueron tratados térmicamente. La caracterización fisicoquímica de los inóculos LAG y LA se presenta en la Tabla 5.2, el LAG presentó un mayor contenido de sólidos y DQO, además de la forma esférica de los gránulos (Figura 5.1b).

El inóculo tiene un rol fundamental en el proceso de codigestión, se prefieren inóculos mixtos debido a la facilidad de trabajar con ellos ya que no requieren condiciones de asepsia, aunque es muy importante la etapa de pretratamiento para reducir las especies de tipo metanogénico que no resisten estos procesos.



Figura 5.1a. Lodo anaerobio (LA)

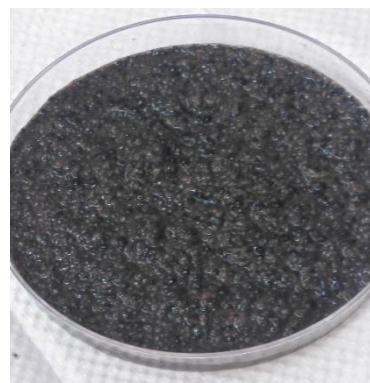


Figura 5.1b Lodo anaerobio granular (LAG)

Tabla 5.2 Características de los inóculos

Parámetro	LA	LAG
pH	7.20	7.83
ST (%)	36.6	46.6
SV (%)	28.2	35.4
DQO (g L^{-1})	56.2	66.3
NTK (g L^{-1})	4.1	3.14

ST Sólidos Total; SV sólidos Volátiles; DQO Demanda Química de Oxígeno

5.3 Etapa 1. Reactores en lote

Después de la caracterización de los sustratos para la codigestión y los inóculos, se realizó el ensayo en los reactores en lote con el fin de evaluar el potencial de la codigestión de los sustratos elegidos, siguiendo el diseño de experimentos PB con la matriz presentada en la Tabla 4.2 del Capítulo IV.

5.3.1 Producción de Biogás y BH₂

Se monitoreó la evolución de los 18 biorreactores. El volumen acumulativo de biogás de los experimentos después de 140 h se muestra en la Tabla 5.3. Los volúmenes acumulativos mayores de biogás, corresponden a los puntos centrales de la matriz PB, con un valor promedio de $2221 \pm 6 \text{ mL L}^{-1}_{\text{Reactor}}$ de los reactores R6, R14 y R16. Los reactores más efectivos corresponden a los puntos centrales del diseño de experimentos con las condiciones experimentales: relación C/N=30, 37°C y el LAG. En el caso de los tres reactores con igual relación C/N=30 y temperatura de 37°C, pero inoculados con LA (R2, R17 y R18), la producción de biogás fue 30% menor. Observamos que, del resto de reactores, los que resultaron con menor producción de biogás ($<500 \text{ mL L}^{-1}_{\text{Reactor}}$) también fueron inoculados con LA, lo que muestra que para este experimento el mejor inóculo resultó ser LAG.

El análisis cromatográfico de las muestras de biogás reveló que los productos de la reacción fueron H₂ y CO₂, y en ningún caso se identificó la presencia de CH₄, lo que indica que el tratamiento térmico aplicado al inóculo resultó efectivo ya que inhibió a los microorganismos de tipo metanogénico. Es importante mencionar que la producción de BH₂ presentó la misma tendencia que la generación de biogás, al obtener composiciones de BH₂ de 20 al 23% en los ensayos de los microrreactores R2, R17, R18, R6, R14, R16. Otros reactores que presentaron composiciones menores para la producción de H₂ ($<8\%$), fueron los reactores R7>R9>R13, inoculados con LAG, aunque R7 y R13 se alimentaron con la mezcla cuya relación C/N fue de 20, de ellos el mejor fue R7, con una temperatura de incubación de 55°C. Para este par de reactores se puede atribuir la mayor producción de BH₂ al efecto de la temperatura, ya que en algunos estudios se ha

reportado que el aumento de temperatura favorece la hidrólisis del sustrato [31]. El reactor R13, alimentado con una relación C/N=40 presentó la menor producción de los tres reactores, probablemente debido a que a pesar de tener una mayor cantidad de CHT la temperatura a la cual fue incubado (25 ± 2 °C) no favoreció la actividad microbiana.

Tabla 5.3 Resultados de la producción de biogás y BH₂ para los experimentos en lote.

Reactor	Relación C/N	Temperatura °C	Inóculo	Biogás mL·L _{reactor}	BH ₂ mL·L ⁻¹ ¹ Reactor	BH ₂ mL·gsv ⁻¹
1	20	55	LA	268	-	-
2	30	37	LA	1556	223	-
3	20	25	LA	700	-	-
4	40	25	LA	875	-	-
5	40	55	LAG	1025	-	-
6	30	37	LAG	2225	366	21.52
7	20	55	LAG	787	84	6.24
8	20	55	LAG	787	-	-
9	40	25	LAG	713	36	3.24
10	20	25	LA	700	-	-
11	40	25	LA	567	-	-
12	20	55	LA	331	-	-
13	20	25	LAG	700	20	1.6
14	30	37	LAG	2215	365	30.6
15	40	55	LA	362	5	-
16	30	37	LAG	2225	367	28.67
17	30	37	LA	1556	223	-
18	30	37	LA	1558	212	-

Del análisis de los resultados para el diseño de experimentos PB, en la gráfica de Pareto de efectos estandarizados (Figura 5.2), se observa que el tipo de inóculo es el factor significativo ($P < 0.05$) de 0.001 (Tabla 5.4) con respecto al volumen de biogás producido. En el caso del LAG su fortaleza probablemente se atribuye a la forma esférica de los gránulos (<2mm), con la ventaja de la distribución de los diferentes microorganismos en capas [143]. De acuerdo con Hernández y col., las bacterias fermentativas se encuentran distribuidas en las capas exteriores del gránulo, facilitando el contacto directamente con los sustratos, mientras que en las capas intermedias se encuentran las bacterias

acetogénicas incluyendo a las productoras de hidrógeno, donde la dinámica poblacional coadyuva en el proceso redox [144]. Además, se ha reportado que los lodos granulares son más resistentes a la inhibición por sustrato comparados con los lodos dispersados [77]. El siguiente factor en importancia (aunque no de significancia estadística de acuerdo con el análisis reportado en la tabla 5.4) fue la relación C/N, los reactores alimentados con C/N de 30 fueron los mayores productores tanto de biogás como de BH_2 . Esto se puede atribuir a efectos sinérgicos de balance de nutrientes, así como a la capacidad buffer que aportan los lodos a la mezcla para tener un control natural del pH, evitando así la acidificación de los reactores y por consecuencia la inhibición en la producción de hidrógeno [145]. Para el caso de la composición de hidrógeno (Figura 5.3), el factor significativo es también el inóculo ($P < 0.05$) 0.008 Tabla 5.5), seguido por la temperatura. Este resultado es consistente con lo observado en la producción de BH_2 , ya que para los reactores alimentados con la relación C/N 30, todos incubados a 37 °C, los tres reactores inoculados con LAG presentaron un incremento en la producción de BH_2 .

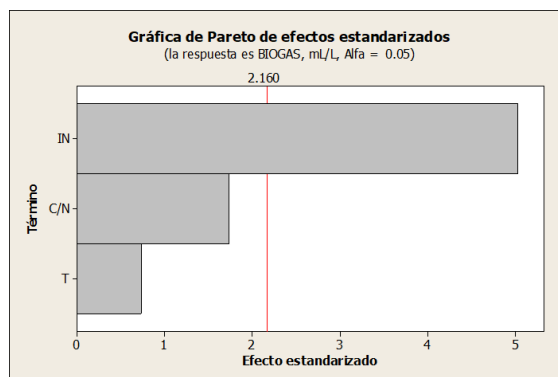


Figura 5.2 Gráfica de Pareto para producción de biogás

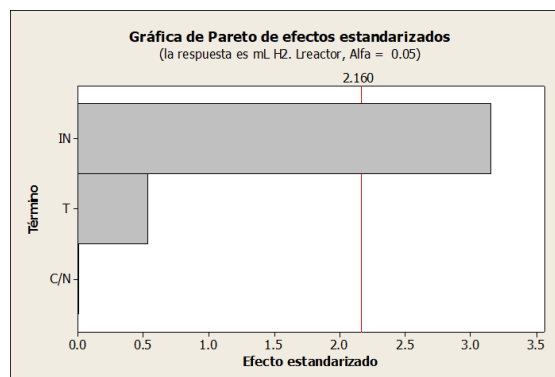


Figura 5.3 Gráfica de Pareto para producción de hidrógeno

Tabla 5.4. Niveles de las diferentes variables y análisis estadístico para la producción de biogás del diseño de experimentos PB.

Variable	Nivel bajo (-1)	Nivel alto (+1)	Efecto	t-valor	P-valor
Relación C/N	20	40	180.5	1.73	0.107
Temperatura (°C)	25±2	55	-76	-0.73	0.476
Inóculo	LAG	LA	-426	-5.02	0.001

Tabla 5.5. Niveles de las diferentes variables y análisis estadístico para la producción de hidrógeno del diseño de experimentos PB.

Variable	Nivel bajo (-1)	Nivel alto (+1)	Efecto	t- valor	P- valor
Relación C/N	20	40	0.17	0.01	0.551
Temperatura (°C)	25±2	55	-11.83	-0.54	0.601
Inóculo	LAG	LA	-56.78	-3.15	0.008

5.3.2 Análisis cinético de la producción fermentativa de H₂

Para describir el progreso del proceso en lote de la producción fermentativa de BH₂, los datos experimentales se analizaron con la ecuación de Gompertz modificada presentada en el capítulo IV (4.4.2), de esta manera se obtuvieron los parámetros cinéticos que se muestran en la Tabla 5.6.

Tabla 5.6 Coeficientes de la ecuación de Gompertz para la producción de hidrógeno a diferentes condiciones.

Reactor	Relación C/N	Temperatura °C	H ₂ max mL L ⁻¹	Rm mL L ⁻¹ h ⁻¹	λ h	r ²
R7	20	55	26.9	1.9	20	0.7
R9	40	25	17.5	5.0	23	0.90
R13	20	25	33	0.7	21	1.0
R14	30	37	86.6	2.6	1.95	0.99
R15	40	55	n.c	n.c	n.c	n.c

n.c no calculado

El comportamiento de la producción de BH₂ fue descrito adecuadamente por el modelo, mostrando coeficientes de correlación (r²) de 0.9-1, excepto para el R7 cuya r² fue 0.7. Las fases de latencia se presentaron de 1.95 a 23 horas, los reactores que se mantuvieron a menor temperatura son los que presentan fases de adaptación más largas (R13 Y R9) con relaciones C/N de 20 y 40 analizados a 25 °C, los valores de H_{max} fueron 33 y 17.5 mL L⁻¹, respectivamente, sin embargo el R7 H_{max} fue 26.9 mL·L⁻¹, el cual, a pesar de que se mantuvo a una temperatura de incubación alta (55°C), presenta una fase de latencia similar, esta discrepancia puede estar asociada al menor contenido de CHT en relación al nitrógeno (C/N 20). Sin embargo, la hidrólisis de las CFs como melón y piña,

puede ser un paso limitante en la digestión anaerobia, y se debe buscar estrategias para mejorar el desempeño.

La curva de producción acumulativa de H_2 (Fig. 5.4a) se obtuvo con los datos de los reactores en lote R6, R14 y R16 que fueron ensayados con las mismas condiciones en cuanto a composición y temperatura de incubación. Para estos reactores se obtuvieron mejores resultados, de acuerdo con la Tabla 5.6 ya que se observa la mejor productividad con una fase de adaptación más corta (λ). La velocidad más alta de producción de biohidrógeno fue $2.6 \text{ mL}\cdot\text{L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ para los reactores de los puntos centrales. Este resultado se explica por la sinergia entre los sustratos y el inóculo. En contraste se muestra también la gráfica del ajuste de Gompertz para R13 (Fig. 5.4b), en la que se observa la fase de latencia mucho más larga (21h) y menor producción del BH_2 con una H_{\max} de $33 \text{ mL}\cdot\text{L}^{-1}$. El uso de cáscaras de frutas en este trabajo podría estar limitando el proceso de hidrólisis de los polisacáridos y en consecuencia no es posible aprovechar de manera efectiva la fuente de carbón, considerando que la mayor concentración de carbohidratos se encuentra presente en la fruta y no solamente en las CFs como es el caso del sustrato empleado en este experimento.

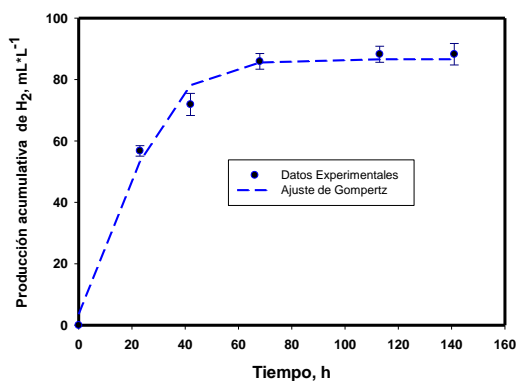


Figura 5.4a Ajuste de la producción acumulativa de hidrógeno con la ecuación de Gompertz modificada para R14

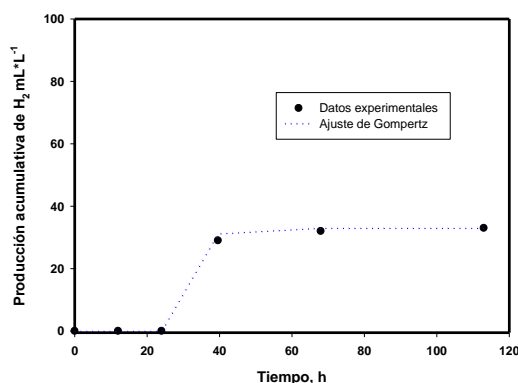


Figura 5.4b Ajuste de la producción acumulativa de hidrógeno con la ecuación de Gompertz modificada para R13

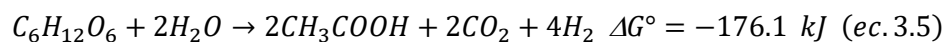
Los resultados de productividad de BH_2 muestran que, con este proceso, es posible el aprovechamiento de lodos para la generación de energía renovable,

ya que actualmente a nivel mundial éstos representan un problema de falta de espacio para su disposición final y el riesgo de contaminación de los mantos freáticos [146].

5.3.3 Monitoreo de subproductos y otros parámetros

Como parte del estudio de la evolución de los reactores inoculados con LAG, se realizó el monitoreo de parámetros como: pH, CHT, DQO y ácido acético (Tabla 5.7). El pH destaca entre los factores más importantes que afectan la ruta metabólica y el rendimiento en la producción de H₂. En este trabajo se ajustaron todos los reactores a un pH inicial de 5.5, y al término de la reacción, los ensayos con mayor producción de H₂ (R6, R14 y R16), presentaron un pH final de 5.1, valor dentro del intervalo de pH favorable para la producción fermentativa de H₂ (5.5-7) [147], incluso hay autores que reportan valores de pH desde 4.5 a 7 para residuos de alimentos como lo menciona Ghimre en su revisión de literatura [30]; el resto de los reactores con menor producción de biogás e hidrógeno mostraron valores finales de pH 4. Los valores de pH menores a 4.5 demuestran la acidificación de los reactores como consecuencia de la generación de otros metabolitos solubles, como ácido acético y etanol.

Como se ha reportado en la literatura, la fermentación puede llevar a la formación de solventes como etanol, acetona y ácidos grasos volátiles como acético, butírico y propiónico. De acuerdo con la Ecuación 3.5 se pueden obtener 4 moles de hidrógeno por la ruta del acetato, mientras que por la ruta del butirato solo se obtienen 2 moles de hidrógeno (Ecuación 3.6)



Como parte de las evidencias de producción de hidrógeno durante el proceso de FO en los reactores, se realizó la cuantificación de ácido acético y etanol. Para toda la serie de experimentos (Tabla 5.7), se presentó un aumento en la producción de ácido acético, principalmente para el reactor R6 con 3600 mg·L⁻¹,

seguido por los reactores R4, R9 y R14, cuya producción fue menor (45 a 60%). Este resultado coincidió con el análisis bibliográfico, donde se reporta que la producción de hidrógeno está asociada con la producción de ácidos grasos volátiles, en particular con el ácido acético. Por otra parte, el etanol es indicativo de que el proceso de acidogénesis es el que predomina. A partir de los resultados obtenidos, los reactores R6, R14 y R16 mantienen constante la concentración de etanol producido (3.25 ± 0.25) durante todo el experimento.

Tabla 5.7. Monitoreo de parámetros durante el proceso de codigestión de CFs y LP

Reactor		R4	R5	R6	R7	R8	R9	R13	R14	R16
pH	I ₀	5.5	5.5	5.5	5.5	5.5	5.5	5.5	5.5	5.5
	F	3.75	4.27	5.1	4.26	4.24	4.3	3.8	5.1	5.1
DQO g L ⁻¹	I ₀	60.4	49.1	44.3	34.6	34.3	68.7	39.7	44.3	44.3
	F	30.1	27.3	21.9	14.7	18	31.7	19.1	21.7	23.6
CHT mg L ⁻¹	I ₀	2177	2156	2500	755	910	2312	889	2500	2500
	F	798	882	1235	411	540	922	640	1250	1200
Etanol	I ₀	5	4.7	3.9	3	3.3	4.7	3.3	5	5
%v/v	F	4.4	5	3.4	1.3	1.9	4.5	3.7	3.5	3.5
SV g L ⁻¹	I ₀	45.7	45.5	47.3	46.9	46.3	45.3	46.1	47.3	47.3
	F	41.7	36.8	30.3	33.45	33.9	34.2	34.1	35.4	34.5
Ácido acético mg L ⁻¹	I ₀	800	880	680	880	960	960	560	800	800
	F	3000	4320	3600	2120	2400	1880	1400	3580	3600

En la Figura 5.5 se muestra la evolución del pH para los reactores de los puntos centrales, uno inoculado con LAG y el otro con LA. Observamos que con el inóculo LAG el pH disminuyó en menor medida que el inoculado con LA, es decir con LAG se mantuvo dentro del intervalo favorable para la producción de BH₂ [30]. En el caso de la producción de ácido acético (Figura 5.6), se evidenció que alrededor de las 72 h es mayor para el reactor inoculado con LA y por consecuencia la disminución de pH. La producción de BH₂ se da principalmente durante la fase de crecimiento exponencial de especies como el *Clostridium*, mientras que en la fase estacionaria se observa el cambio de acidogénesis hacia

la producción de solventes. Estos cambios en el metabolismo microbiano para la producción de solventes se dan a pH menor de 5 [30, 148], lo que coincide con los valores de pH observados para los reactores al final del proceso.

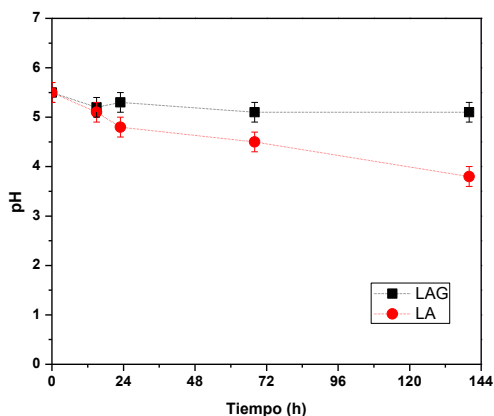


Figura 5.5. Resultados de pH de los reactores de puntos centrales durante el proceso de FO.

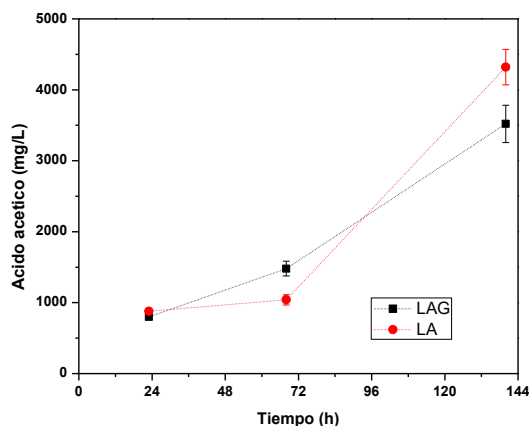


Figura 5.6 Producción de ácido acético de los reactores de puntos centrales durante el proceso de FO

Respecto a la determinación de los CHT, se observó que en todos los reactores se presentó un consumo en el intervalo de 30 a 60%, durante las 140 h de incubación. La mayor transformación se llevó a cabo durante las primeras 24 h, para los reactores productores de BH_2 se observa que el consumo de CHT se favorece a mayor temperatura cuando la relación $\text{C/N}=20$.

La DQO representa el contenido orgánico de sustrato biodegradable; por lo tanto, su remoción representa el grado de hidrólisis alcanzado por las bacterias acidogénicas. Para este estudio es evidente que las concentraciones de DQO presentaron la misma tendencia de los carbohidratos, al disminuir en promedio 50%. La mayor DQO removida se observó en las primeras 40 horas del proceso de codigestión y coincidió con la zona de adaptación y crecimiento exponencial de los microorganismos. Para los reactores con producción de BH_2 también se observa que con la relación de $\text{C/N}=20$ la remoción se favorece con el aumento de temperatura, mientras que los puntos centrales con la relación $\text{C/N}=30$

alcanzan una remoción de DQO alrededor de 50% con una menor temperatura respecto de los de C/N 20 incubados a 55°C.

La Tabla 5.8 muestra las mejores condiciones de operación en estudios de codigestión utilizando diversos sustratos. Los resultados mostrados en este estudio resultan menores a los reportados en esas investigaciones, usando mezclas de codigestión en reactores en RB, sin embargo, en este estudio, la remoción de DQO fue mayor.

Tabla 5.8 Comparativa del rendimiento en la producción de H₂ de diversos estudios

Reactor Modo de Operación	Codigestión	Inóculo/ Pretratamiento	Condiciones	H ₂ Rendimiento mL H ₂ gVS ⁻¹	% DQO Removida	Referencia
Batch	Residuos Frutas– Vegetales	Lodo anaerobio/ HST	C/N = No reportada pH = 5.5 * T = 35 °C V = 0.5 L 37 g DQO L ⁻¹	60	25	[100]
Batch	Suero de leche— Residuos Frutas– Vegetales	Lodo anaerobio, HST	C/N = 21, pH = 5.5 * T = 37 °C V = 2 L 144.133 g DQO L ⁻¹	1449.8 mL H ₂ (g L DQO) ⁻¹	16	[109]
CSTR	Residuos de alimentos	Cultivo mixto enriquecido, without HST	C/N = 15 T = 39 °C, pH = 6.5 * 4.5 L	89.8	No reportado	[134]
Batch	Fracción orgánica de residuos municipales– Residuos de alimentos	Estiércol de vaca, STT	C/N = No reportado pH = 4.0 T = 30 °C V = 0.125 L 100 g SV. Kg ⁻¹	14	No reportado	[149]
Batch	Cáscaras de frutas–Lodos primaries	LAG,TT	C/N = 30 pH = 5.5 T = 37 °C V = 0.1 L 44.3 g DQO L ⁻¹	25	50%	Este trabajo

* con control de pH; TT = Tratamiento térmico; CSTR = Tanque continuo agitado por sus siglas en ingles Continuous Stirred-Tank Reactor.

5.4 Etapa 2. Reactor anaerobio híbrido de flujo ascendente (RAHFA) a escala laboratorio

Después de determinar el potencial de producción de H_2 de la mezcla de codigestión, se procedió a montar el reactor a escala laboratorio, el cual fue operado en modo continuo, bajo las condiciones de temperatura, relación C/N y el inóculo que fueron más favorecedoras para la producción de BH_2 en la evaluación de los microrreactores de la etapa 1.

La operación del reactor anaerobio híbrido de flujo ascendente se llevó a cabo evaluando los TRH de 24, 12 y 6 h, para este efecto se fijaron algunas condiciones descritas en el siguiente punto.

5.4.1. Preparación de mezcla de codigestión para la alimentación del reactor

El potencial para la producción de H_2 depende del contenido de carbohidratos en el sustrato, los resultados muestran que las CFs son un sustrato adecuado para la producción fermentativa de H_2 ya que contienen de 6 a 12.5 g de CHT /100 g sustrato (Tabla 5.1) susceptibles de ser degradados por esta vía. Para garantizar una proporción adecuada de nutrientes, es decir una relación C/N =30 de acuerdo con los experimentos en lote, se realizó la mezcla con lodos primarios para garantizar la proporción adecuada de nitrógeno, nutriente importante en el proceso. Además, se fijaron las condiciones iniciales de pH, sólidos, DQO y CHT de la mezcla de acuerdo con lo expresado en la Tabla 5.9

Tabla 5.9 Características fisicoquímicas de la mezcla de codigestión.

Parámetro	Mezcla de sustratos C/N 30
Ph	6.0
ST, g/L	5
STV, g/L	3
DQO, g/L	9
CHT, g/L	5
NTK, mg/L	167

5.4.2 Evaluación de los TRH de 24,12 y 6 h

El RAHFA fue operado durante 60 días con TRHs de 24, 12 y 6 horas, La mayor producción de biogás y de BH_2 se observa en la Figura 5.7, durante el TRH de 24 h, con tendencia a disminuir a medida que el TRH se acorta. El volumen máximo de gas producido fue 274 ± 10 , 76 ± 3 y $50 \pm 5 \text{ mL} \cdot \text{h}^{-1}$ mientras que de BH_2 se produjeron 67 ± 5 , 19 ± 4 , $7 \pm 1 \text{ mL} \cdot \text{h}^{-1}$ para los TRH de 24, 12 y 6 h respectivamente.

En cuanto al biogás se encontró que la composición de BH_2 alcanzó valores de 30, 26 y 14 % como se enlista en la tabla 5.10. La presencia de metano fue detectada en valores del 9 y 4% para los TRHs de 24 y 6 h y de 6 % para 12 h, esta cantidad de metano detectada en el biogás puede atribuirse a especies nativas presentes en la mezcla de alimentación que contiene LP, ya que esta mezcla no está en condiciones estériles. Podemos observar que el efecto de acortar el TRH causa una disminución en la composición de BH_2 , así como en la producción de biogás. Esta inestabilidad del reactor observada en la composición puede atribuirse a la problemática que representa el uso de residuos orgánicos de alimentos, en este caso la CFs cuando los reactores son operados por largos periodos de tiempo, mientras que el decaimiento en la composición de BH_2 puede atribuirse también al cambio en las poblaciones microbianas que participan en el proceso de codigestión debido al cambio en condiciones como el pH, que en nuestro caso de estudio no fue controlado.

Tabla 5.10 Composición del biogás a diferentes TRH.

TRH, h	% H_2	% CH_4	% CO_2
24	30 ± 1.5	9 ± 1	67 ± 2
12	26 ± 6	6 ± 1	68 ± 5
6	14 ± 2	4 ± 2	81 ± 5

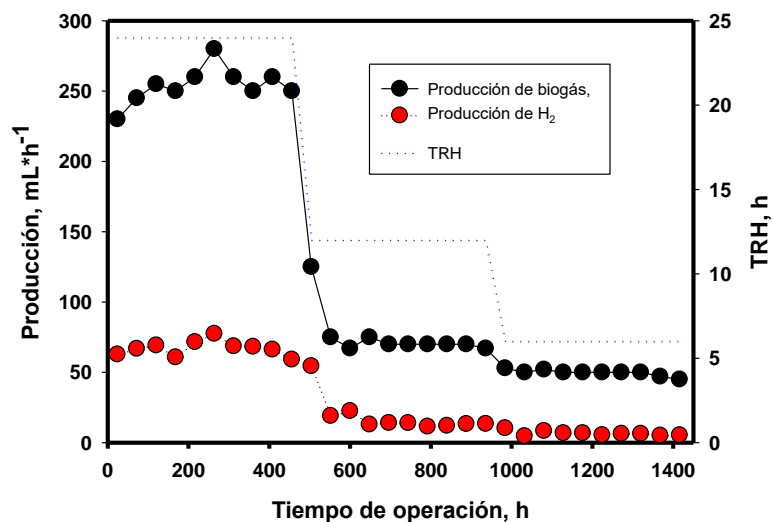
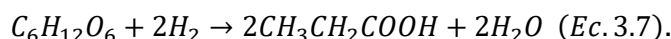


Figura 5.7. Producción de biogás y de H_2 en el proceso de codigestión a TRH de 24, 12 y 6 h

La Figura 5.8 muestra los valores de pH y de AGVs, para los TRH de 24, 12 y 6 h. El pH inicial de la mezcla de codigestión se fijó en 6, durante el proceso este parámetro no fue controlado. Observamos que hay una tendencia de disminución del pH conforme el TRH disminuye. El pH para el TRH de 24 h es 5.1, para 12 h es 4.7 y para TRH de 6 h es 4.55, esta tendencia en la disminución de pH fue observada también por Fountoulakis [150], aunque numerosas investigaciones establecen que el pH adecuado para la mayor producción de H_2 es 5.5, las diferencias pueden deberse al tipo de inóculo utilizado, así como al tipo de reactor y sustratos. En este estudio el pH más bajo determinado es 4.55, la influencia del pH es un punto clave durante la producción de H_2 ya que también tiene injerencia en el control de microorganismos metanogénicos y en el posible cambio de rutas metabólicas orientadas a la producción de solventes cuando se presentan valores de pH menores a 4 [77].

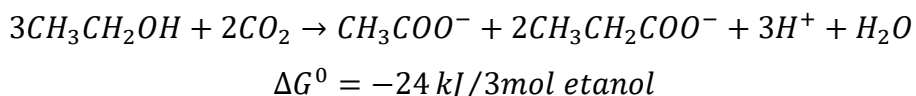
La evolución de los subproductos de la codigestión de CFs con LP en los diferentes tiempos de retención hidráulicos también coinciden con la correlación respecto al pH (véase Figura 5.8). Para el TRH de 24 h, y pH=5.01, los subproductos generados fueron: ácido acético >> ácido butírico > ácido isobutírico. Para el tiempo de retención hidráulico de 12 h, la presencia de ácidos

grasos se triplicó y se observó un cambio en la presencia de los ácidos grasos ácido butírico > ácido valérico > ácido propiónico > ácido acético > isobutírico; esto para el menor tiempo de retención hidráulico, donde la co-digestión desarrolló un pH más ácido, la producción de ácidos grasos se incrementó casi al doble, pero el comportamiento fue semejante (ácido butírico > ácido valérico > ácido propiónico > ácido acético > iso-butírico). En general, la presencia del ácido acético y butírico favorece la producción de H₂. Esto concuerda con los resultados obtenidos por Santiago y col. que encontraron una mayor producción de estos ácidos para el TRH (48h) en el cual se dio la mayor producción de H₂ 544 ml H₂ g hexosa⁻¹ a 25°C [151]; sin embargo, para los TRH de 12 y 6 h se observó el incremento en la producción del ácido propiónico, este metabolito se relaciona con el consumo de H₂ [134] de acuerdo a la ecuación 3.7 donde al seguir esta ruta metabólica el H₂ es consumido para la producción de ácido propiónico.



Estos resultados ratifican que la ruta de acetogénesis es predominante para el tiempo de retención hidráulico de 24 h, permitiendo la reducción de los iones H⁺ en solución y la consecuente producción de bio-hidrógeno.

La reducción de pH (<4.8) está relacionada con el incremento de ácidos no disociados que inhiben a los productores de H₂ [151]. La acumulación de AGVs se relaciona con un cambio en la ruta metabólica de los microorganismos; sin embargo, para los TRH de 12 y 6 h, a pesar de que el pH desciende a valores menores que 4.8, lo que se observa es la disminución en el porcentaje de etanol (Figura 5.9). Se ha documentado que en algunos casos se presenta la fermentación del etanol y acetato a butirato [152] o del etanol a acetato y propionato [153, 154] de acuerdo con la siguiente reacción:



Esta descripción del consumo de etanol coincide con los resultados obtenidos, ya que el etanol y el acetato se consumen para TRH de 12 y 6 h y se observa el aumento en la concentración de los ácidos butírico, isobutírico y propiónico.

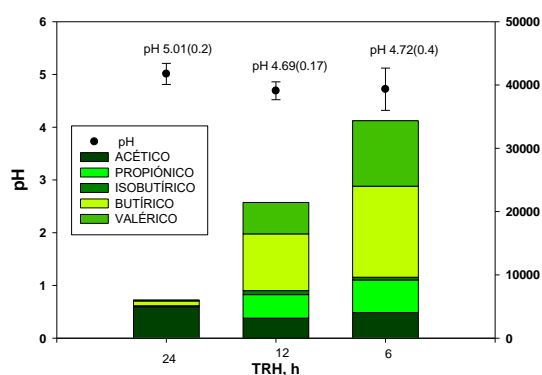


Figura 5.8 pH y AGV's producidos durante los TRH de 24, 12 y 6 h.

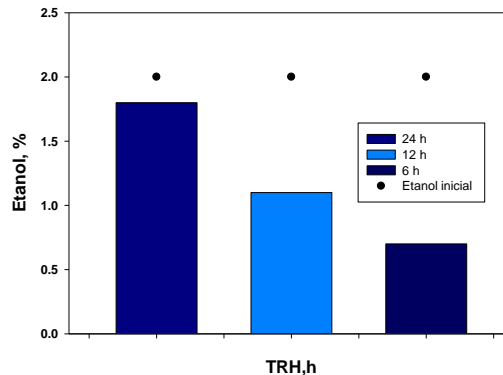


Figura 5.9 Etanol medido en el reactor a los TRH de 24, 12 y 6 h.

Se realizó el monitoreo de CHT y DQO del reactor durante los diferentes TRH estudiados, en la Figura 5.10 se observa que el consumo de CHT es mayor para 12 h así como la degradación de DQO, mientras que se reduce el consumo de CHT la degradación de DQO para TRH de 6 h.

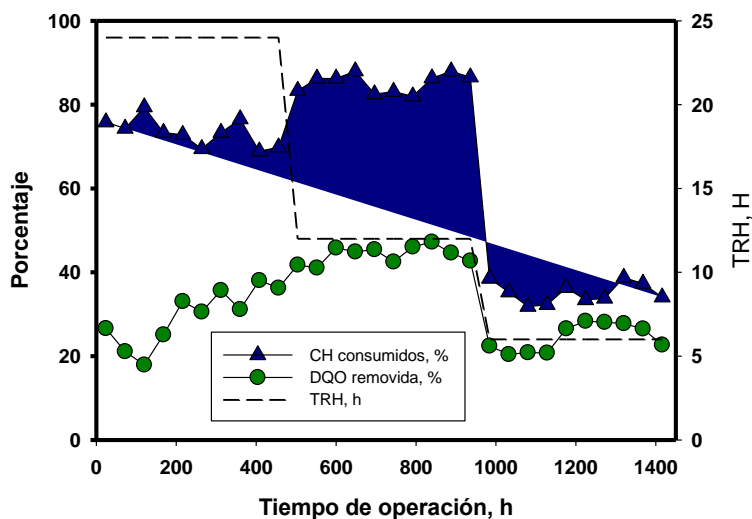


Figura 5.10. Consumo de CHT y remoción de DQO del proceso de codigestión a diferentes TRH.

Se observa que para 12 y 24 h el consumo de CHT y la DQO removida son mayores, sin embargo, al determinar tanto la productividad como el rendimiento de BH_2 , el TRH de 24 h resulta más eficiente presentando valores más altos.

Acorde a la Figura 5.11 la tasa de producción de hidrógeno disminuyó de 1150 ± 91 , 322 ± 62 , 112 ± 20 $\text{mL H}_2 \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{día}^{-1}$, mientras que el rendimiento fue de 650 ± 50 , 48 ± 4 , 20 ± 2 $\text{mL H}_2 \cdot \text{g}^{-1} \text{DQO}_{\text{removida}}$ para los TRH de 24, 12 y 6 h respectivamente, tanto el rendimiento como la productividad decrecen junto con el TRH.

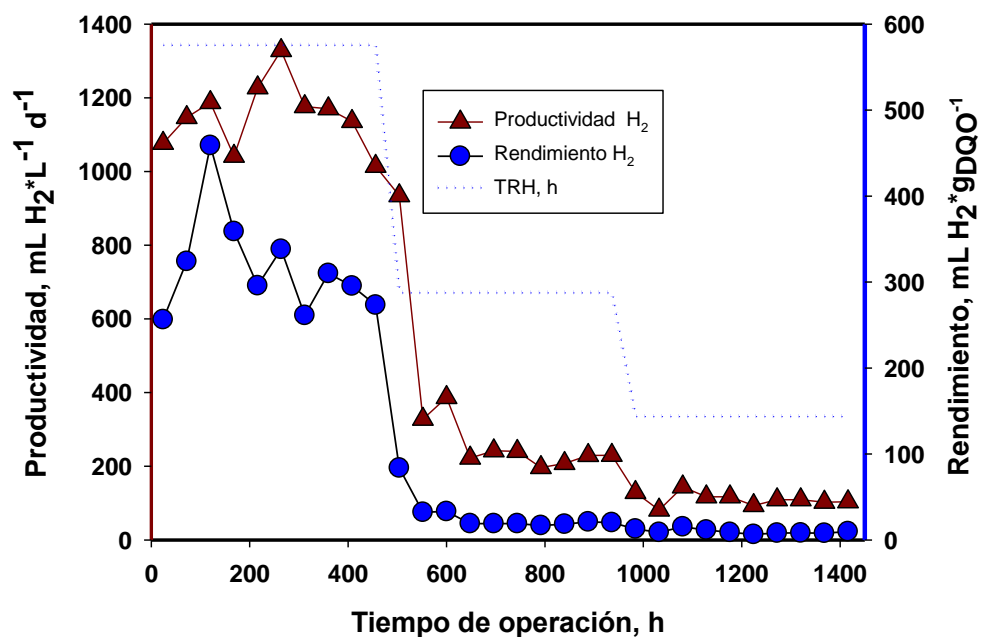


Figura 5.11. Productividad y rendimiento para BH_2 en el proceso de codigestión

5.4.3 Análisis de la diversidad microbiana

El desarrollo de la fermentación de BH_2 , rutas metabólicas seguidas, así como el desempeño del reactor biológico dependen de la diversidad microbiana presente. Los microorganismos que producen H_2 utilizan enzimas del tipo hidrogenasas las cuales catalizan tanto la producción como el consumo de H_2 . Se clasifican en tres categorías de acuerdo con la presencia de cofactores metálicos en sitios activos [155,156].

Para conocer la ecología microbiana presente en el inóculo, así como en el reactor a los diferentes TRH, se tomaron muestras para cada TRH de 24, 12 y 6

h, se realizó la extracción de ADN y su identificación por secuenciación de amplicones.

5.4.3.1 Diversidad microbiana en el Inóculo

La Figura 5.12 muestra la clasificación taxonómica y abundancia de las bacterias presentes en el lodo granular anaerobio que fue utilizado como inóculo, en el proceso de codigestión. Se obtuvieron un total de 8038 secuencias, las cuales fueron comparadas con la base de datos, el 18% de las secuencias no fueron identificadas taxonómicamente. De las secuencias con afiliación taxonómica, se identificaron 9 Filos, de los cuales *Firmicutes* representa la mayor composición con 71%

Los filos *Firmicutes* y *Bacteroidetes* son bacterias hidrolíticas cuya función es descomponer macromoléculas en azúcares simples, tienen la característica de ser estables en amplios intervalos de condiciones medioambientales. Estas bacterias también participan en la segunda etapa de la co-digestión anaerobia en conjunto con *Proteobacteria* y *Chloroflex* son bacterias acidogénicas, convirtiendo los azúcares en AGVs [6], todas ellas presentes en el inóculo utilizado (Figura 5.17)

Algunas de las bacterias presentes como *Bacteroides*, *Lactobacillus* y *Enterobacter* son no esporulantes, estas prevalecieron en el inóculo, a pesar del pretratamiento térmico. Este hallazgo ya fue reportado por Pendyala, quien ha reportado que estos microorganismos aún después del pretratamiento continúan presentes [157], posiblemente debido a la característica granular del inóculo que está formado por capas [144] que probablemente sirvan de protección a algunos de estos microorganismos.

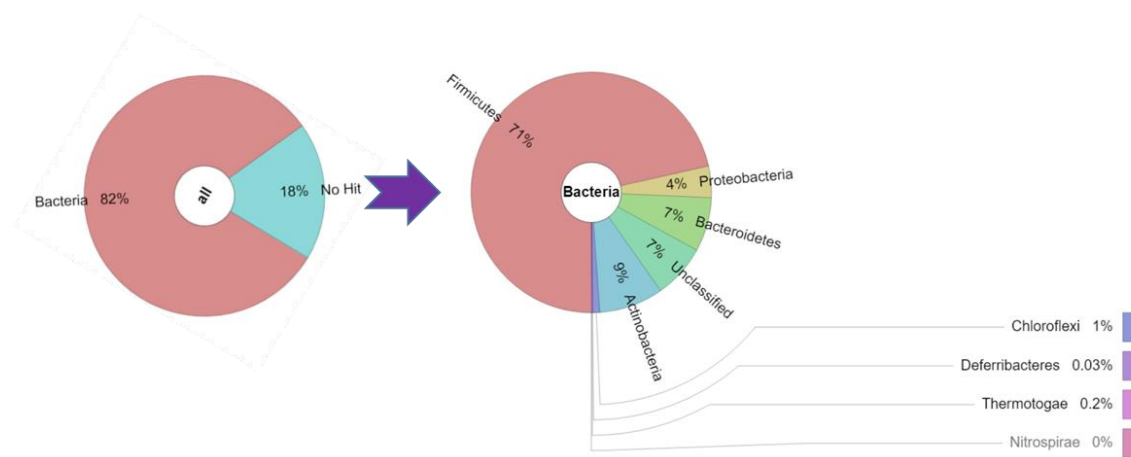


Figura 5.12 Clasificación taxonómica hasta nivel Filo y su abundancia en el inóculo.

La distribución y abundancia de las familias identificadas se puede observar en la Figura 5.13 y corresponde principalmente a *Veillonellaceae* 36%, *Clostridiaceae* 13% y *Lactobacillaceae* 11%. La familia *Veillonellaceae* representa el 51% de las OTUs de las *Firmicutes* analizadas. Los miembros de estas familias son anaerobios estrictos, existen en hábitats como ríos, lagos, el intestino de los invertebrados [158]. Existen reportes que establecen que *Firmicutes* contribuyen a la producción de H_2 .

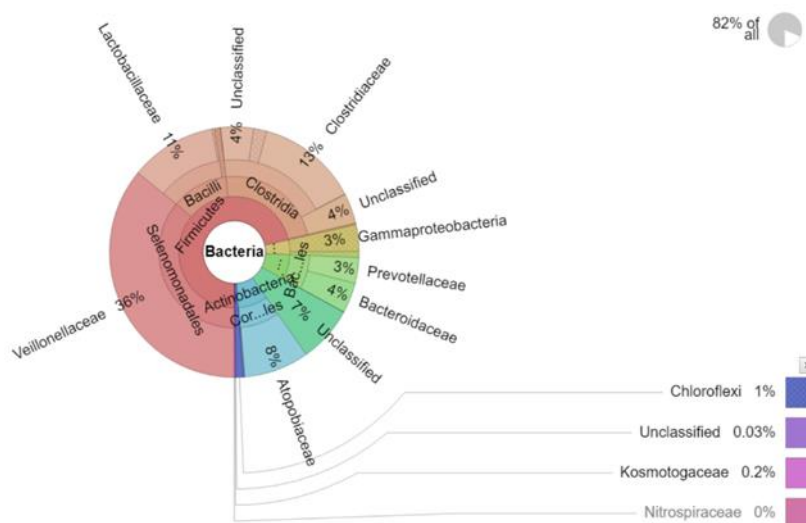


Figura 5.13. Clasificación taxonómica y abundancia del inóculo utilizado hasta nivel Familia.

En la Figura 5.14 que corresponde a la clasificación taxonómica hasta nivel de especie, es posible observar la predominancia de los géneros (un nivel taxonómico previo al de especie): *Megasphaera* 33%, *Clostridium* 13%,

1



1

1

1

como *Clostridium* y *Lactobacillus* disminuyen ligeramente, lo que explica la menor presencia de AGV's en esta etapa. Según Marone y col., cuando los sustratos de la fermentación oscura son vegetales, los análisis de secuenciación han reportado proporciones dominantes de las especies *Megaesphaera*, con su variante *Megaesphaera elsdenii* [160]. Esta especie quimiotrófica participa en la producción de BH_2 [146].

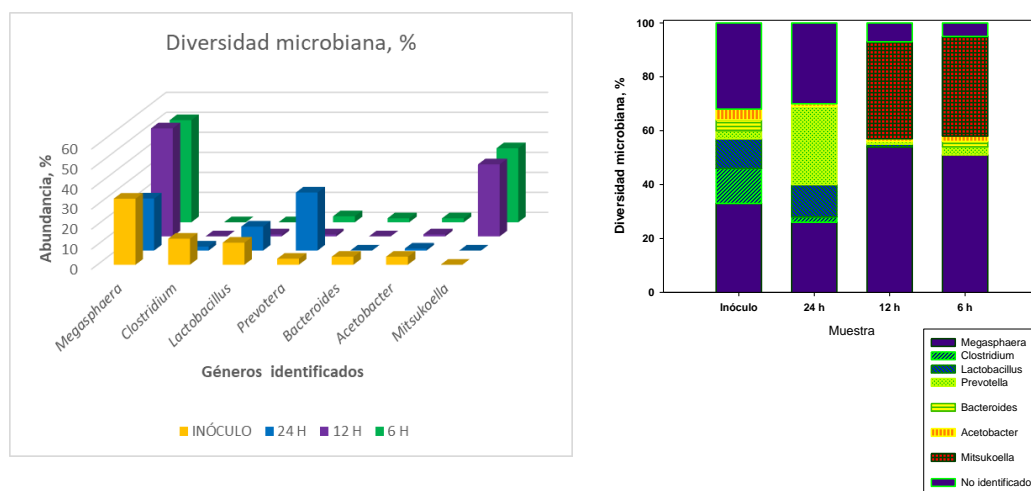


Figura 5.15 Evolución de la diversidad microbiana a nivel especie en el proceso de codigestión de cáscaras de frutas y lodos de una planta de tratamiento en un reactor híbrido de flujo ascendente a diferentes tiempos de retención hidráulicos 24, 12 y 6

Para el caso de este trabajo, al acortar el THR a 12 y 6 h se incrementó la presencia del género *Megasphaera*, especie reportada como anaerobia estricta. De acuerdo con el análisis de literatura, se favorece el crecimiento de las especies *M. cerevisiae*, *M. elsdenii*, *M. micronuciformis*, *M. paucivorans* y *M. sueciensis*, a $\text{pH} > 5.5$, originando la formación de los productos de la acidogénesis como acetato, propionato, butirato, valerato y CO_2 [162], esto se evidencia en la Figura 5.8 por el aumento considerable de AGVs hasta valores tres y cuatro veces mayores para los TRH de 12 y 6 h respectivamente, comparados con los AGVs producidos para el TRH de 24h. Sin embargo, la habilidad de estas especies para la producción de H_2 es baja [163] comparada con la producción de las especies de *Clostridium*.

La especie *Mitsuokella multiacida* fue detectada en el reactor cuando se acorta el TRH a 12 y 6h, cabe destacar que esta especie no está presente en el

inóculo por lo que su presencia se debe a los sustratos usados. Su origen es el rumen y las heces de vertebrados, es anaerobia estricta, su temperatura óptima de desarrollo es de 37 a 42°C, la presencia de CHT favorece su crecimiento, sin embargo, se destaca que no es una gran productora de gas a partir de glucosa [154]. Esto se refleja en la Figura 5.7 en la que para los TRH de 12 y de 6 h la disminución en la producción de biogás es notable coincidiendo con el aumento de esta especie en el reactor de acuerdo con la Figura 5.15. Los principales productos de fermentación de la *Mitsuokella multiacida* son el ácido láctico, el ácido acético, y en una menor proporción el ácido succínico. A esta especie se le atribuye la inhibición de la dinámica poblacional de las especies *Clostridium* y *Lactobacillus* en reactor continuo, porque produce ciertas toxinas que inhiben el crecimiento de dichos microorganismos [164].

Finalmente, al analizar la evolución de las especies microbianas en el reactor (Figura 5.15) y la composición del biogás producido a los diferentes TRH (Tabla 5.10) se observa que no se suprimieron totalmente los microorganismos metanogénicos, atribuyéndose este hecho a la naturaleza de los sustratos y que al disminuir el TRH se inhibieron especies de alta producción de BH_2 como el *Clostridium*. Este comportamiento es similar al reportado en el estudio del efecto de TRH para el control de la metanogénesis y homoacetogénesis usando agua residual sintética [94], sin embargo en nuestro estudio las especies favorecidas a TRH más cortos fueron *Megaesphaera* y *Mitsuokella*.

Se constata también que la evolución de las especies microbianas es fuertemente influenciada por el tipo de sustrato utilizado, como en el caso de Gómez Romero; en su estudio uno de los sustratos usados fue suero de queso y la especie dominante durante el proceso de codigestión fue *Lactobacillus* (72%), a pesar de que en el inóculo su abundancia era menor al 1%. En el presente estudio se evidencia por la aparición de *Mitsuokella multiacida* que no estaba presente en el inóculo inicial, y el incremento del género *Megaesphaera* que como se comentó previamente, su presencia es característica al utilizar residuos de alimentos como sustratos [145].

CAPÍTULO VI

CONCLUSIONES Y

RECOMENDACIONES

6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

6.1 Conclusiones

Es posible la codigestión de CFs y LP para la producción de H_2 , en un reactor RHAFA a escala laboratorio, al balancear la relación C/N.

A partir de los resultados del diseño de experimentos PB se concluye que el factor de mayor relevancia para la codigestión de CFs y LP provenientes de la PTAR municipal, fue la fuente de inóculo para la producción del biogás, así como para la producción de hidrógeno, seguido por la relación C/N, La mejor mezcla de codigestión fue la que tiene la relación C/N de 30, inoculada con LAG, incubada a 37°C.

El mayor volumen acumulativo de biogás fue $2221 \pm 5.8 \text{ mL L}^{-1} \text{ reactor}$ con una composición de BH_2 de 23% y un rendimiento de $27 \text{ mL H}_2 \cdot \text{g SV}^{-1}$.

La producción de ácido acético aumentó durante el desarrollo de la codigestión como probable evidencia de que la producción de H_2 fue favorecida por la ruta de acetogénesis.

El modelo cinético de fermentación presentó el ajuste adecuado al modelo de Gompertz para los reactores R6, R14 y R16. con las condiciones de relación C/N= 30, Inóculo LAG alcanzando una H_{\max} de $86.6 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$, $R_m = 2.6 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, y una $\lambda = 1.95 \text{ h}$.

Las condiciones de relación C/N=30, CO de $375 \text{ mg (L} \cdot \text{h)}^{-1}$, temperatura (T) de 37 °C, y un TRH= 24 h sin control de pH favorecieron la codigestión de CFs y LP en un RAHFA mostrando los siguientes rendimientos: $650 \pm 50 (24 \text{ h}) > 48 \pm 4 (12 \text{ h}) > 20 \pm 2 (6 \text{ h}) \cdot \text{mL H}_2 \cdot \text{g}^{-1} \text{DQO}_{\text{removida}}$.

De acuerdo con el análisis de diversidad microbiana la producción de H_2 se atribuye a las especies de *Megasphaera clostridium*, *Lactobacillus* y *Prevotella*, presente en el reactor a TRH de 24 h, con una composición de 26%, 2%, 12%, y 29% respectivamente. Mientras que especies prometedoras o principales productoras de H_2 como *Clostridium* y *Lactobacillus*, fueron inhibidas a TRH de 12 y 6 h cuando las condiciones favorecieron la acidogénesis.

Finalmente fue posible operar el RAHFA de manera continua por un periodo de 60 días.

6.2 Recomendaciones

Buscar estrategias para garantizar la prevalencia de microorganismos productores de inóculo en el reactor como es el *Clostridium* o bien su bioaumentación durante el proceso de operación del reactor.

Realizar estudios de pH controlado para mejorar la estabilidad del reactor y evitar los cambios en las rutas metabólicas a la producción de metabolitos que acidifiquen el reactor o la producción de solventes.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] P.T. Sekoai, K.O. Yoro, M.O. Bodunrin, A.O. Ayeni, M.O. Daramola, Integrated system approach to dark fermentative biohydrogen production for enhanced yield, energy efficiency and substrate recovery, *Rev. Environ. Sci. Bio/Technology*. 17 (2018) 501–529. <https://doi.org/10.1007/s11157-018-9474-1>.
- [2] Pavi S, Kramer LE, Gomes LP, Alcides L, Miranda S. Bioresource Technology Biogas production from co-digestion of organic fraction of municipal solid waste and fruit and vegetable waste (2017) ;228:362–7.
- [3] C. Technologies, Resources to reserves 2013: Oil, gas and coal technologies for the energy markets of the future, (2013). <https://doi.org/10.1787/9789264090705-en>.
- [4] Disponible en:(<https://www.ipcc.ch/sr15/chapter/glossary/>).
- [5] J. Zhao, G. Li, W. Cui, Q. Cao, H. Zhang, Important evidence of constant low CO₂ windows and impacts on the non-closure of the greenhouse effect, *Sci. Rep.* 9 (2019) 5033. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41562-x>.
- [6] M. Ni, D.Y.C. Leung, M.K.H. Leung, K. Sumathy, An overview of hydrogen production from biomass, *Fuel Process. Technol.* 87 (2006) 461–472. <https://doi.org/10.1016/j.fuproc.2005.11.003>.
- [7]S. Mehariya, A.K. Patel, P.K. Obulisamy, E. Punniyakotti, J.W.C. Wong, Co-digestion of food waste and sewage sludge for methane production: Current status and perspective, *Bioresour. Technol.* 265 (2018) 519–531. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.04.030>.
- [8] S. Rama Mohan, Structure and growth of research on biohydrogen generation using wastewater, *Int. J. Hydrogen Energy*. 40 (2015) 16056–16069. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2015.08.072>.
- [9] A. Gadhe, S.S. Sonawane, M.N. Varma, Kinetic analysis of biohydrogen production from complex dairy wastewater under optimized condition, *Int. J. Hydrogen Energy*. 39 (2013) 1306–1314. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2013.11.022>.
- [10] Disponible en:
https://apps1.semarnat.gob.mx:8443/dgeia/informe_resumen14/05_atmosfera/5_2_2.html
- [11] Disponible en (<http://globalcarbonatlas.org>),
- [12] Ley general de cambio climático, Congreso de la Unión, DOF. (2018) 1–45.

- [13] P.J. Coldwell, A. Ricardo, F. Quiroga, F.Z. Reyes, Reporte de avance de energías Limpias Primer Semestre 2018. SENER, (2018).
- [14] Disponible en [<http://sie.energia.gob.mx>]
- [15] M. Balat, Potential importance of hydrogen as a future solution to environmental and transportation problems, *Int. J. Hydrogen Energy*. 33 (2008) 4013–4029. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2008.05.047>.
- [16] A. Demirbas, Green energy and technology, Capítulo 5 (2013). <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>.
- [17] SENER, Prospectiva de Energías Renovables 2015 - 2029, (2015) 1–79. http://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/44324/Prospectiva_Energ_as_Renovables_2015_-_2029_VF_22.12.15.pdf.
- [18] S.V. Mohan, G. Mohanakrishna, S. Srikanth, Biohydrogen production from industrial effluents, *Biofuels*. (2011) 499–524. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385099-7.00023-1>.
- [19] P. Preuster, C. Papp, P. Wasserscheid, Liquid Organic Hydrogen Carriers (LOHCs): Toward a Hydrogen-free Hydrogen Economy, (2017). <https://doi.org/10.1021/acs.accounts.6b00474>.
- [20] I. Dincer, C. Acar, Review and evaluation of hydrogen production methods for better sustainability, *Int. J. Hydrogen Energy*. 40 (2015) 11094–11111. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2014.12.035>.
- [21] L.B. Brentner, J. Peccia, J.B. Zimmerman, Challenges in developing biohydrogen as a sustainable energy source: implications for a research agenda, *Environ. Sci. Technol*. 44 (2010) 2243–2254. <https://doi.org/10.1021/es9030613>.
- [22] F. Bonk, M. Hedegaard, Dark fermentation biorefinery in the present and future (bio) chemical industry, *Rev. Environ. Sci. Bio/Technology*. 14 (2015) 473–498. <https://doi.org/10.1007/s11157-015-9369-3>.
- [23] M. Bao, H. Su, T. Tan, Biohydrogen production by dark fermentation of starch using mixed bacterial cultures of *Bacillus* sp and *Brevumdimonas* sp., *Energy and Fuels*. 26 (2012) 5872–5878. <https://doi.org/10.1021/ef300666m>.
- [24] S.Y. Wu, C.Y. Lin, K.S. Lee, C.H. Hung, J.S. Chang, P.J. Lin, F.Y. Chang, Dark fermentative hydrogen production from xylose in different bioreactors using sewage sludge microflora, *Energy and Fuels*. 22 (2008) 113–119. <https://doi.org/10.1021/ef700286s>.
- [25] S.A. Blanco Londoño, Producción de biohidrógeno a través de la fermentación oscura de residuos – Revisión crítica, (2013) 118. <http://www.bdigital.unal.edu.co/46306/>.

- [26] W. Han, J. Fang, Z. Liu, J. Tang, Techno-economic evaluation of a combined bioprocess for fermentative hydrogen production from food waste, *Bioresour. Technol.* 202 (2016) 107–112. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.11.072>.
- [27] J. Wongthanate, K. Chinnacotpong, M. Khumpong, Impacts of pH, temperature, and pretreatment method on biohydrogen production from organic wastes by sewage microflora, *Int. J. Energy Environ. Eng.* 5 (2014) 6. <https://doi.org/10.1186/2251-6832-5-6>.
- [28] S. Yossan, S. O-Thong, P. Prasertsan, Effect of initial pH, nutrients and temperature on hydrogen production from palm oil mill effluent using thermotolerant consortia and corresponding microbial communities, *Int. J. Hydrogen Energy.* 37 (2012) 13806–13814. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2012.03.151>.
- [29] A. Karlsson, L. Vallin, J. Ejlerthsson, Effects of temperature, hydraulic retention time and hydrogen extraction rate on hydrogen production from the fermentation of food industry residues and manure, *Int. J. Hydrogen Energy.* 33 (2008) 953–962. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2007.10.055>.
- [30] A. Ghimire, L. Frunzo, F. Pirozzi, E. Trably, R. Escudie, P.N.L. Lens, G. Esposito, A review on dark fermentative biohydrogen production from organic biomass : Process parameters and use of by-products, *Appl. Energy.* 144 (2015) 73–95. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2015.01.045>.
- [31] P. Sivagurunathan, G. Kumar, P. Bakonyi, S.H. Kim, T. Kobayashi, K.Q. Xu, G. Lakner, G. Tóth, N. Nemestóthy, K. Bélafi-Bakó, A critical review on issues and overcoming strategies for the enhancement of dark fermentative hydrogen production in continuous systems, *Int. J. Hydrogen Energy.* 41 (2016) 3820–3836. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2015.12.081>.
- [32] A. Singh, D. Rathore, Biohydrogen production: Sustainability of current technology and future perspective, 2016. <https://doi.org/10.1007/978-81-322-3577-4>.
- [33] S. Njakou, D. Blumberga, Bioresource Technology Comparative life cycle assessment of three biohydrogen pathways, *Bioresour. Technol.* 102 (2011) 2684–2694. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.10.139>.
- [34] J. Ortigueira, L. Alves, L. Gouveia, P. Moura, Third generation biohydrogen production by *Clostridium butyricum* and adapted mixed cultures from *Scenedesmus obliquus* microalga biomass, *FUEL.* 153 (2015) 128–134. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2015.02.093>.
- [35] Disponible en:
(<http://rtbioenergia.org.mx/wp-content/uploads/2016/11/Sergio-Gasca-%C3%81lvarez.pdf>).

[36] Disponible en <https://www.gob.mx/sener/articulos/atlas-nacional-de-biomasa>

[37] Disponible en:
<https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/554385/DBGIR-15-mayo-2020.pdf>
Disponible en (<http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones2/libros/705/solidos.pdf>)

[38] Disponible en:
https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/261712/2017_1303_INFORME_FINAL_IMTA-SENER.pdf

[39] Alibardi L, Cossu R. Composition variability of the organic fraction of municipal solid waste and effects on hydrogen and methane production potentials. *Waste Manag.* 2015;36:147–55.
<https://doi.org/10.1016/j.wasman.2014.11.019>

[40] Centro Nacional de Control de Energía (CENACE), Programa de Ampliación y Modernización de la Red Nacional de Transmisión y Redes Generales de Distribución del Mercado Electro Mayorista. PRODESEN 2019-2033, (2019) 576.

[41] SENER, PRODESEN 2018-2032, (2018).

[42] PRODESEN, Programa de Desarrollo del Sistema Eléctrico Nacional 2016 - 2030, Prodesen 2016-2030. (2016) 1–165. <https://doi.org/10.1007/s13398-014-0173-7.2>.

[43] T. Studer, Isabel; González, Alejandro; Contreras, Energías renovables para la competitividad en México, (2014).

[44] Disponible en <https://www.gob.mx/sener/articulos/plan-nacional-para-la-produccion-de-hidrocarburos-200804>

[45] E. Pérez-Denicia, F. Fernández-Luqueño, D. Vilariño-Ayala, L. Manuel Montaña-Zetina, L. Alfonso Maldonado-López, Renewable energy sources for electricity generation in Mexico: A review, *Renew. Sustain. Energy Rev.* 78 (2017) 597–613. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2017.05.009>.

[46] Lee KT, Ofori-Boateng C. Sustainability of biofuel production from oil palm biomass. vol. 138. 2013. <https://doi.org/10.1007/978-981-4451-70-3>.

[47] Agnieszka Zawadzka, Liliana Krzystek, Paweł Stolarek & Stanisław Ledakowicz (2010) Biodrying of Organic Fraction of Municipal Solid Wastes, *Drying Technology*, 28:10, 1220-1226, DOI: 10.1080/07373937.2010.483034 <https://doi.org/10.1080/07373937.2010.483034>

[48] Disponible en

https://www.ecorfan.org/bolivia/researchjournals/Sistemas_Experimentales/vol4num10/Revista_de_Sistemas_Experimentales_V4_N10_5.pdf

[49] Disponible en:

(<https://dgel.energia.gob.mx/qa/INEL/INELV5/CleanEnergies.html>)

[50] H.M. Poggi-Varaldo, K.M. Munoz-Paez, C. Escamilla-Alvarado, P.N. Robledo-Narváez, M.T. Ponce-Noyola, G. Calva-Calva, E. Ríos-Leal, J. Galíndez-Mayer, C. Estrada-Vázquez, A. Ortega-Clemente, N.F. Rinderknecht-Seijas, Biohydrogen, biomethane and bioelectricity as crucial components of biorefinery of organic wastes: A review, *Waste Manag. Res.* 32 (2014) 353–365. <https://doi.org/10.1177/0734242X14529178>.

[51] M. Alexandropoulou, G. Antonopoulou, G. Lyberatos, Food Industry Waste's Exploitation via Anaerobic Digestion and Fermentative Hydrogen Production in an Up-Flow Column Reactor, *Waste and Biomass Valorization*. 7 (2016) 711–723. <https://doi.org/10.1007/s12649-016-9544-y>.

[52] D. Balachandar, G., Khanna, N., Das, Biohydrogen Production from Organic Wastes, Springer Singapore, Singapore, 2013. <https://doi.org/10.1007/978-981-10-4675-9>.

[53] D. Moya, C. Aldás, G. López, P. Kaparaju, Municipal solid waste as a valuable renewable energy resource: A worldwide opportunity of energy recovery by using Waste-To-Energy Technologies, *Energy Procedia*. 134 (2017) 286–295. <https://doi.org/10.1016/j.egypro.2017.09.618>.

[54] N.M. Jiménez Martínez, La gestión integral de residuos sólidos urbanos en México: entre la intención y la realidad, *Let. Verdes. Rev. Latinoam. Estud. Socioambientales*. 17 (2015) 29–56. <https://doi.org/10.17141/letrasverdes.17.2015.1419>.

[55] Disponible en: www.Elfinanciero.com.mx/monterrey/incineran-basura-para-generar-más-energía-limpia).

[56] C. Ramos, Effect of the initial total solids concentration and initial pH on the bio-hydrogen production from cafeteria food waste, 7 (2012) 3–10. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2012.06.051>.

[57] CONAGUA, Agenda del Agua 2030, 2011th ed., México, 2011.

[58] INECC, Mitigación del cambio climático, (2018).

[59] B. Craig, B. Cantwell, F. Wolak, Wastewater as a Valuable Resource, (2010).

[60] Instituto Mexicano de Tecnología del Agua, Revisión y actualización del potencial de biomasa para generación de energía eléctrica a partir de plantas de tratamiento de aguas residuales presentado en el Inventario Nacional de

Energías Renovables (INERE), (2016) 121.
https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/261712/2017_1303_INFORME_FINAL_IMTA-SENER.pdf.

[61] Metcalf & Eddy Inc., Tchobanoglous, G., Burton, F. L., Tsuchihashi, R., & Stensel, H. D. (2013). Wastewater engineering: Treatment and resource recovery (5th ed.). McGraw-Hill Professional

[62] B.K. Behera, A. Varma, Microbial resources for sustainable energy, 2016.
<https://doi.org/10.1007/978-3-319-33778-4>.

[63] S.N.A. Rahman, M.S. Masdar, M.I. Rosli, E.H. Majlan, T. Husaini, S.K. Kamarudin, W.R.W. Daud, Overview biohydrogen technologies and application in fuel cell technology, *Renew. Sustain. Energy Rev.* 66 (2016) 137–162.
<https://doi.org/10.1016/j.rser.2016.07.047>.

[64] S. Dutta, A review on production, storage of hydrogen and its utilization as an energy resource, *J. Ind. Eng. Chem.* 20 (2014) 1148–1156.
<https://doi.org/10.1016/j.jiec.2013.07.037>.

[65] O. Bičáková, P. Straka, Production of hydrogen from renewable resources and its effectiveness, *Int. J. Hydrogen Energy.* 37 (2012) 11563–11578.
<https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2012.05.047>.

[66] K. Chandrasekhar, Y.-J. Lee, D.-W. Lee, Biohydrogen Production: Strategies to Improve Process Efficiency through Microbial Routes, *Int. J. Mol. Sci.* 16 (2015) 8266–8293. <https://doi.org/10.3390/ijms16048266>.

[67] A. Bedoya, J.C. Castrillón, J.C. Ramírez J.E., Vásquez and M. Arias (2008). Producción biológica de hidrógeno: Una aproximación al estado del arte. *Dyna*.75, 154, 137-157.

[68] J.D. Holladay, J. Hu, D.L. King, Y. Wang. An overview of hydrogen production technologies. *Catal Today* 139 (2009) 244–60.
<https://doi.org/10.1016/j.cattod.2008.08.039>.

[69] H. Argun, F. Kargi, Bio-hydrogen production by different operational modes of dark and photo-fermentation: An overview, *Int. J. Hydrogen Energy.* 36 (2011) 7443–7459. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2011.03.116>.

[70] M.Y. Azwar, M.A. Hussain, A.K. Abdul-Wahab, Development of biohydrogen production by photobiological, fermentation and electrochemical processes: A review, *Renew. Sustain. Energy Rev.* 31 (2014) 158–173.
<https://doi.org/10.1016/j.rser.2013.11.022>.

[71] E. Eroglu, A. Melis, Photobiological hydrogen production: Recent advances and state of the art, *Bioresour. Technol.* 102 (2011) 8403–8413.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.03.026>.

- [72] S. Manish, R. Banerjee, Comparison of biohydrogen production processes, *Int. J. Hydrogen Energy*. 33 (2008) 279–286. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2007.07.026>.
- [73] Pandu, K., & Joseph, S. (2012). Comparisons and limitations of biohydrogen production processes: a review. *International Journal of Advances in Engineering & Technology*, 2(1), 2231–1963.
- [74] S.V. Mohan, K. Chandrasekhar, P. Chiranjeevi, P.S. Babu, Biohydrogen Production from Wastewater, in: *Biohydrogen*, Elsevier, 2013: pp. 223–257. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-59555-3.00010-6>.
- [75] Ramesh y Chowdhary, & Kumar, G. (2016), Biotechnological and bioinformatics approaches for augmentation of biohydrogen production, *Renewable and sustainable Energy Reviews*, 56, 1194-1206
- [76] P.C. Hallenbeck, D. Ghosh, M.T. Skonieczny, V. Yargeau, Microbiological and engineering aspects of biohydrogen production, *Indian J. Microbiol.* 49 (2009) 48–59. <https://doi.org/10.1007/s12088-009-0010-4>.
- [77] E. Elbeshbishy, B.R. Dhar, G. Nakhla, H.S. Lee, A critical review on inhibition of dark biohydrogen fermentation, *Renew. Sustain. Energy Rev.* 79 (2017) 656–668. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2017.05.075>.
- [78] V. Gadhamshetty, Y. Arudchelvam, N. Nirmalakhandan, D.C. Johnson, Modeling dark fermentation for biohydrogen production : ADM1-based model vs . Gompertz model, *Int. J. Hydrogen Energy*. 35 (2010) 479–490. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2009.11.007>.
- [79] J.K. Kim, L. Nhat, Y.N. Chun, S.W. Kim, Hydrogen production conditions from food waste by dark fermentation with *Clostridium beijerinckii* KCTC 1785, *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 13 (2008) 499–504. <https://doi.org/10.1007/s12257-008-0142-0>.
- [80] A. Castillo-Hernandez, I. Mar-Alvarez, I. Moreno- Andrade, Start-up and operation of continuous stirred-tank reactor for biohydrogen production from restaurant organic solid waste, 40 (2015) 17239-17245. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2015.04.046>.
- [81] D.G. Cirne, X. Paloumet, L. Björnsson, M.M. Alves, B. Mattiasson, Anaerobic digestion of lipid-rich waste-Effects of lipid concentration, *Renew. Energy*. 32 (2007) 965–975. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2006.04.003>.
- [82] S. Zahedi, D. Sales, L.I. Romero, R. Solera, Dark fermentation from real solid waste. Evolution of microbial community, *Bioresour. Technol.* 151 (2014) 221–226. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.10.063>.

- [83] H.M. Falk, P. Reichling, C. Andersen, R. Benz, Online monitoring of concentration and dynamics of volatile fatty acids in anaerobic digestion processes with mid-infrared spectroscopy, *Bioprocess Biosyst. Eng.* 38 (2015) 237–249. <https://doi.org/10.1007/s00449-014-1263-9>.
- [84] M.A. Khan, H.H. Ngo, W. Guo, Y. Liu, X. Zhang, J. Guo, S.W. Chang, D.D. Nguyen, J. Wang, M. Atiqueuzzaman, H. Hao, W. Guo, Y. Liu, X. Zhang, J. Guo, S. Woong, D. Duc, J. Wang, Biohydrogen production from anaerobic digestion and its potential as renewable energy, *Renew. Energy.* (2017). <https://doi.org/10.1016/j.renene.2017.04.029>.
- [85] I. Ntaikou, G. Antonopoulou, G. Lyberatos, Biohydrogen production from biomass and wastes via dark fermentation: A review, *Waste and Biomass Valorization.* 1 (2010) 21–39. <https://doi.org/10.1007/s12649-009-9001-2>.
- [86] L. Singh, Z.A. Wahid, Journal of Industrial and Engineering Chemistry Methods for enhancing bio-hydrogen production from biological process: A review, *J. Ind. Eng. Chem.* 21 (2015) 70–80. <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2014.05.035>.
- [87] A. Xia, A. Jacob, C. Herrmann, J.D. Murphy, Fermentative bio-hydrogen production from galactose, *Energy.* 96 (2016) 346–354. <https://doi.org/10.1016/j.energy.2015.12.087>.
- [88] E. Tapia-Venegas, J.E. Ramirez-Morales, F. Silva-Illanes, J. Toledo-Alarcón, F. Paillet, R. Escudie, C.H. Lay, C.Y. Chu, H.J. Leu, A. Marone, C.Y. Lin, D.H. Kim, E. Trably, G. Ruiz-Filippi, Biohydrogen production by dark fermentation: scaling-up and technologies integration for a sustainable system, *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* 14 (2015) 761–785. <https://doi.org/10.1007/s11157-015-9383-5>.
- [89] M. Navarro-Díaz, I. Valdez-Vazquez, A. E. Escalante, Ecological perspectives of hydrogen fermentation by microbial consortia: What we have learned and the way forward, *International Journal of Hydrogen Energy*, 41, (2016), 17297-17308, <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2016.08.027>. Navarro-Díaz et al., 2016).
- [90] L. Poleto, P. Souza, F.E. Magrini, L.L. Beal, A.P. Rodrigues Torres, M. Paula De Sousa, J.P. Laurino, S. Paesi, Selection and identification of microorganisms present in the treatment of wastewater and activated sludge to produce biohydrogen from glycerol, *Int. J. Hydrogen Energy.* 41 (2016) 4374–4381. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2015.06.051>.
- [91] G. Buitrón, C. Carvajal, Bioresource Technology Biohydrogen production from Tequila vinasses in an anaerobic sequencing batch reactor: Effect of initial substrate concentration, temperature and hydraulic retention time, 101 (2010) 9071–9077. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.06.127>.

- [92] C. Lin, C. Lay, B. Sen, C. Chu, Fermentative hydrogen production from wastewaters : A review and prognosis, *Int. J. Hydrogen Energy*. 37 (2012) 15632–15642. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2012.02.072>.
- [93] I. Valdez-Vazquez, H.M. Poggi-Varaldo, Hydrogen production by fermentative consortia, *Renew. Sustain. Energy Rev.* 13 (2009) 1000–1013. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2008.03.003>.
- [94] B. Si, J. Li, B. Li, Z. Zhu, R. Shen, The role of hydraulic retention time on controlling methanogenesis and homoacetogenesis in biohydrogen production using upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactor and packed bed reactor (PBR), *Int. J. Hydrogen Energy*. 40 (2015) 11414–11421. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2015.04.035>.
- [95] X. Wang, G. Yang, Y. Feng, G. Ren, X. Han, Optimizing feeding composition and carbon–nitrogen ratios for improved methane yield during anaerobic co-digestion of dairy, chicken manure and wheat straw, *Bioresour. Technol.* 120 (2012) 78–83. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2012.06.058>.
- [96] I. Valdez-Vazquez, G.J. Torres-Aguirre, M.L. Molina, Carlos; Ruiz-Aguilar, Graciela, Characterization of a Lignocellulolytic Consortium and Methane Production from Untreated Wheat Straw: Dependence on Nitrogen and Phosphorous Content, *BioResources*. 11 (2016) 4237–4251.
- [97] Y. Lin, S. Wu, D. Wang, Hydrogen-methane production from pulp & paper sludge and food waste by mesophilic-thermophilic anaerobic co-digestion, *Int. J. Hydrogen Energy*. 38 (2013) 15055–15062. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2012.01.051>.
- [98] B. Kirli, I. Karapinar, The effect of HRT on biohydrogen production from acid hydrolyzed waste wheat in a continuously operated packed bed reactor, *Int. J. Hydrogen Energy*. 43 (2018) 10678–10685. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2018.01.175>.
- [99] M. Waligórska, Fermentative hydrogen production - Process design and bioreactors, *Chem. Process Eng. - Inz. Chem. i Proces.* 33 (2012) 585–594. <https://doi.org/10.2478/v10176-012-0048-4>.
- [100] I.E. Garcia-Peña, M., Canul-Chan, I., Chairez, E., Salgado-Manjarez, J. Aranda-Barradas, Biohydrogen production based on the evaluation of kinetic parameters of a mixed microbial culture using glucose and fruit-vegetable waste as feedstocks, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 171 (2013) 279–293. <https://doi.org/10.1007/s12010-013-0341-9>.
- [101] Preethi, T.M.M. Usman, J. Rajesh Banu, M. Gunasekaran, G. Kumar, Biohydrogen production from industrial wastewater: An overview, *Bioresour. Technol. Reports*. 7 (2019) 100287. <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2019.100287>.

- [102] J. Arreola-Vargas, F. Alatriste-Mondragón, L.B. Celis, E. Razo-Flores, A. López-López, H.O. Méndez-Acosta, Continuous hydrogen production in a trickling bed reactor by using triticale silage as inoculum: Effect of simple and complex substrates, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 90 (2015) 1062–1069. <https://doi.org/10.1002/jctb.4410>.
- [103] M. Tena, M. Pérez, R. Solera, Effect of hydraulic retention time on hydrogen production from sewage sludge and wine vinasse in a thermophilic acidogenic CSTR: A promising approach for hydrogen production within the biorefinery concept, *Int. J. Hydrogen Energy*, 46:11 (2021) 7810-7820
- [104] Rafał Łukajtis, Iwona Hołowacz, Karolina Kurcharska, Marta Glinka, Piotr Rybarczyk, Andrzej Przyjazny, Marian Kamiński, Renewable and Sustainable Energy Reviews 91 (2018) 665-694. <http://doi.org/10.1016/j.rser.2018.04.043>
- [105] F. Karaosmanoglu Gorgeç, I. Karapinar, Production of biohydrogen from waste wheat in continuously operated UPBR: The effect of influent substrate concentration, *Int. J. Hydrogen Energy*. 44 (2019) 17323–17333. <https://doi.org/10.1016/J.IJHYDENE.2018.12.213>.
- [106] A. Cruz Méndez, producción de biohidrógeno a partir de una codigestión anaerobia utilizando agua residual de la industria alimenticia en un reactor continuo empleando consorcios microbianos mixtos, Tesis de Maestría, UANL. Febrero 2021].
- [107] R. Saidi, P.P. Liebgott, M. Hamdi, R. Auria, H. Bouallagui, Enhancement of fermentative hydrogen production by *Thermotoga maritima* through hyperthermophilic anaerobic co-digestion of fruit-vegetable and fish wastes, *Int. J. Hydrogen Energy*. (2018) 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2018.10.208>.
- [108] M. Cai, J. Liu, Y. Wei, Enhanced biohydrogen production from sewage sludge with alkaline pretreatment, *Environ. Sci. Technol.* 38 (2004) 3195–3202. <https://doi.org/10.1021/es0349204>.
- [109] J. Gomez-Romero, A. Gonzalez-Garcia, I. Chairez, L. Torres, E.I. García-Peña, Selective adaptation of an anaerobic microbial community: Biohydrogen production by co-digestion of cheese whey and vegetables fruit waste, *Int. J. Hydrogen Energy*. 39 (2014) 12541–12550. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2014.06.050>.
- [110] M.A. Musa, S. Idrus, M.R. Harun, T.F.T.M. Marzuki, A.M.A. Wahab, A comparative study of biogas production from cattle slaughterhouse wastewater using conventional and modified upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactors, *Int. J. Environ. Res. Public Health*. 17 (2020). <https://doi.org/10.3390/ijerph17010283>.

- [111] J. Prakash, R. Sharma, S.K.S. Patel, I.W. Kim, V.C. Kalia, Bio-hydrogen production by co-digestion of domestic wastewater and biodiesel industry effluent, *PLoS One*. 13 (2018) 1–11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0199059>.
- [112] D. Chakraborty, O.P. Karthikeyan, A. Selvam, J.W.C. Wong, Co-digestion of food waste and chemically enhanced primary treated sludge in a continuous stirred tank reactor, *Biomass and Bioenergy*. (2018) 232–240. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2017.06.002>.
- [113] J. Gómez-Romero, A.. González-García, I.. Chairez, L.. Torres, E.I. García-Peña, selective adaptation of an anaerobic microbial community: Biohydrogen production by co-digestion of cheese whey and vegetables fruit wastes, *Waste Manag.* 43 (2015) 144–151. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2015.04.026>.
- [114] O. García-Depraect, J. Gómez-Romero, E. León-Becerril, A. López-López, A novel biohydrogen production process: Co-digestion of vinasse and Nejayote as complex raw substrates using a robust inoculum, *Int. J. Hydrogen Energy*. 42 (2017) 5820–5831. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2016.11.204>.
- [115] M.P. Maciel Pinto, A. Mudhoo, T. de Alencar Neves, M.D. Berni, T. Forster-Carneiro, Co-digestion of coffee residues and sugarcane vinasse for biohythane generation, *J. Environ. Chem. Eng.* 6 (2018) 146–155. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2017.11.064>.
- [116] G. Pagliano, V. Ventorino, A. Panico, I. Romano, A. Robertiello, F. Pirozzi, O. Pepe, The effect of bacterial and archaeal populations on anaerobic process fed with mozzarella cheese whey and buttermilk, *J. Environ. Manage.* 217 (2018) 110–122. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.03.085>.
- [117] W. Prapinagsorn, S. Sittijunda, A. Reungsang, Co-digestion of napier grass and its silage with cow dung for bio-hydrogen and methane production by two-stage anaerobic digestion process, *Energies*. 11 (2018). <https://doi.org/10.3390/en11010047>.
- [118] H. Argun, S. Dao, Bio-hydrogen production from waste peach pulp by dark fermentation: Effect of inoculum addition, *Int. J. Hydrogen Energy*. 42 (2017) 2569–2574. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2016.06.225>.
- [119] G. Cappai, G. De Gioannis, A. Muntoni, D. Spiga, M.R. Boni, A. Poletti, R. Pomi, A. Rossi, G. Cappai, G. De Gioannis, A. Muntoni, D. Spiga, M.R. Boni, A. Poletti, R. Pomi, A. Rossi, Biohydrogen Production from Food Waste: Influence of the Inoculum-To-Substrate Ratio, *Sustain*. 2018, Vol. 10, Page 4506. 10 (2018) 4506. <https://doi.org/10.3390/SU10124506>.
- [120] B. Basak, A. Fatima, B.-H. Jeon, A. Ganguly, P.K. Chatterjee, A. Dey, Process kinetic studies of biohydrogen production by co-fermentation of fruit-

vegetable wastes and cottage cheese whey, *Energy Sustain. Dev.* 47 (2018) 39–52. <https://doi.org/10.1016/j.esd.2018.08.004>.

[121] A. Ferreira, P. Marques, B. Ribeiro, P. Assemany, H. Vieira, D. Mendonça, A. Barata, A. Cristina, A. Reis, H.M. Pinheiro, L. Gouveia, Combining biotechnology with circular bioeconomy : From poultry , swine , cattle , brewery , dairy and urban wastewaters to biohydrogen, *Environ. Res.* 164 (2018) 32–38. doi: 10.1016/j.envres.2018.02.007. Epub 2018 Feb 22. PMID: 29475106.

[122] A. Rabii, S. Aldin, Y. Dahman, E. Elbeshbishy, A review on anaerobic co-digestion with a focus on the microbial populations and the effect of multi-stage digester configuration, *Energies.* 12 (2019). <https://doi.org/10.3390/en12061106>.

[123] L.A. Pérez-Denicia, E., Fernández-Luqueño, F., Vilariño-Ayala, D., Montañó-Zetina, L.M., Maldonado-López, Renewable energy sources for electricity generation in Mexico: A review, *Renew. Sustain. Energy Rev.* 78 (2017) 597–613. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2009.11.010>.

[124] NMX-AA-015-1985. Contaminación de suelo- Residuos sólidos municipales-Muestreo-Método de cuarteo

[125]PROY-NMX-AA-003/3-SCFI-2008. Aguas residuales- Muestreo- parte 3- Guía para muestreo de aguas residuales.

[126] Water Environment Federation (WEF)., Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater 2540 E, (1998) 1–6. <https://doi.org/10.2105/AJPH.51.6.940-a>.

[127] NMX-AA-034-SCFI-2001. Análisis de agua- Determinación de sólidos y sales disueltas en aguas naturales, residuales y residuales tratadas – Método de prueba.

[128] NMX-AA-030/2-SCFI-2012. Análisis de agua. Determinación de la demanda química de oxígeno en aguas naturales, residuales y residuales tratadas- Método de prueba- parte dos- Método de tubo sellado a pequeña escala.

[129] NMX-AA-026-SCFI-2001. Análisis de agua – Medición de nitrógeno total Kjeldahl en aguas naturales, residuales y residuales tratadas- Método de prueba.

[130] M. Dubois, K.A. Giles, J. Hamilton, P.A. Rebers, F. Simith, Colorimetric method for determination of sugars and related substances., *Anal. Chem.* 28 (1956) 350–356.

[131] R.J. Lowry, Oliver H, Rosebrough, Nira J., Farr, A. Lewis, Randall, protein measurement with the folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.* (1951).

[132] J. Zhang, H. Sun, C. Pan, Y. Fan, H. Hou, Optimization of Process Parameters for Directly Converting Raw Corn Stalk to Biohydrogen by *Clostridium*

sp. FZ11 without Substrate Pretreatment, *Energy and Fuels*. 30 (2016) 311–317. <https://doi.org/10.1021/acs.energyfuels.5b01766>.

[133] A. Gadhe, S.S. Sonawane, M.N. Varma, Optimization of conditions for hydrogen production from complex dairy wastewater by anaerobic sludge using desirability function approach, *Int. J. Hydrogen Energy*. 38 (2013) 6607–6617. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2013.03.078>.

[134] G. Buitrón, G. Kumar, A. Martinez-Arce, G. Moreno, Hydrogen and methane production via a two-stage processes (H₂-SBR + CH₄-UASB) using tequila vinasses, in: *Int. J. Hydrogen Energy*, 2014: pp. 19249–19255. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2014.04.139>.

[135] (-Nucleic Acid Isolation and Purification Manual. www.roche-applied-science.com. -DNA Isolation Methods. *World of Forensic Science*, 2006. Gale Cengage.)

[136] E.I. Garcia-Peña, P. Parameswaran, D.W.. Kang, M. Canul-Chan, R. Krajmalnik-Brown, Anaerobic digestion and co-digestion processes of vegetable and fruit residues: Process and microbial ecology, *Bioresour. Technol.* 102 (2011) 9447–9455. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.07.068>.

[137] M. Atiqueuzzaman, H. Hao, W. Guo, Y. Liu, X. Zhang, J. Guo, S. Woong, D. Duc, J. Wang, Biohydrogen production from anaerobic digestion and its potential as renewable energy, *Renew. Energy*. (2017). <https://doi.org/10.1016/j.renene.2017.04.029>.

[138] I.K. Kapdan, F. Kargi, Bio-hydrogen production from waste materials, *Enzyme Microb. Technol.* 38 (2006) 569–582. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2005.09.015>.

[139] M.A.Z. Bundhoo, R. Mohee, M.A. Hassan, Effects of Pre-Treatment Technologies on Dark Fermentative Biohydrogen Production a Review. *J. Environ. Manage.* 157 (2015) 20–48.Pdf, 157 (2015) 20–48.

[140] N.H.M. Yasin, T. Mumtaz, M.A. Hassan, N. Abd Rahman, Food waste and food processing waste for biohydrogen production: A review, *J. Environ. Manage.* 130 (2013) 375–385. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2013.09.009>.

[141] K. Vijayaraghavan, D. Ahmad, C. Soning, Bio-hydrogen generation from mixed fruit peel waste using anaerobic contact filter, *Int. J. Hydrogen Energy*. 32 (2007) 4754–4760. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2007.07.001>.

[142] D.H. Kim, S.H. Kim, K.Y. Kim, H.S. Shin, Experience of a pilot-scale hydrogen-producing anaerobic sequencing batch reactor (ASBR) treating food waste, *Int. J. Hydrogen Energy*. 35 (2010) 1590–1594. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2009.12.041>.

- [143] W.W. Li, H.Q. Yu, Physicochemical characteristics of anaerobic H₂-producing granular sludge, *Bioresour. Technol.* 102 (2011) 8653–8660. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.02.110>.
- [144] C.E. Hernández-Mendoza, G. Buitrón, Suppression of methanogenic activity in anaerobic granular biomass for hydrogen production, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 89 (2014) 143–149. <https://doi.org/10.1002/jctb.4143>.
- [145] C.E. Hernández-Mendoza, I. Moreno-Andrade, G. Buitrón, Comparison of hydrogen-producing bacterial communities adapted in continuous and discontinuous reactors, in: *Int. J. Hydrogen Energy*, 2014: pp. 14234–14239. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2014.01.014>.
- [146] B. Zhang, G. Li, P. Cheng, Landfill Risk Assessment on Groundwater Based on Vulnerability and Pollution Index, (2016) 1465–1480. <https://doi.org/10.1007/s11269-016-1233-x>.
- [147] C.H. Wang, P.J. Lin, J.S. Chang, Fermentative conversion of sucrose and pineapple waste into hydrogen gas in phosphate-buffered culture seeded with municipal sewage sludge, *Process Biochem.* 41 (2006) 1353–1358. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2006.01.016>.
- [148] S. Venkata Mohan, Y. Vijaya Bhaskar, P. Murali Krishna, N. Chandrasekhara Rao, V. Lalit Babu, P.N. Sarma, Biohydrogen production from chemical wastewater as substrate by selectively enriched anaerobic mixed consortia: Influence of fermentation pH and substrate composition, *Int. J. Hydrogen Energy*. 32 (2007) 21246–2295. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2007.03.015>.
- [149] H.N. Abubackar, T. Keskin, K. Arslan, C. Vural, D. Aksu, D.K. Yavuzylmaz, G. Ozdemir, N. Azbar, Effects of size and autoclavation of fruit and vegetable wastes on biohydrogen production by dark dry anaerobic fermentation under mesophilic condition, *Int. J. Hydrogen Energy*. 44 (2019) 17767–17780. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2019.05.106>.
- [150] M.S. Fountoulakis, S.N. Dokianakis, G. Daskalakis, T. Manios, Fermentative Hydrogen Production from Carob Pod: A Typical Mediterranean Forest Fruit, Waste and Biomass Valorization. 5 (2014) 799–805. <https://doi.org/10.1007/s12649-014-9295-6>.
- [151] S.G. Santiago, E. Trably, E. Latrille, G. Buitrón, I. Moreno-Andrade, The hydraulic retention time influences the abundance of *Enterobacter*, *Clostridium* and *Lactobacillus* during the hydrogen production from food waste, *Lett. Appl. Microbiol.* 69 (2019) 138–147. <https://doi.org/10.1111/lam.13191>.

- [152] R.K. Thauer, K. Jungermann, K. Decker, Energy conservation in chemotrophic anaerobic bacteria, *Bacteriol. Rev.* 41 (1977) 100–180. <https://doi.org/10.1128/membr.41.1.100-180.1977>.
- [153] S. Seeliger, P.H. Janssen, B. Schink, Energetics and kinetics of lactate fermentation to acetate and propionate via methylmalonyl-CoA or acrylyl-CoA, *FEMS Microbiol. Lett.* 211 (2002) 65–70. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(02\)00651-1](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(02)00651-1).
- [154] B. Schink, Energetics of syntrophic cooperation in methanogenic degradation., *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 61 (1997) 262–280. <https://doi.org/10.1128/61.2.262-280.1997>.
- [155] P.M. Vignais, B. Billoud, J. Meyer, Classification and phylogeny of hydrogenases, *FEMS Microbiol. Rev.* 25 (2001) 455–501. [https://doi.org/10.1016/S0168-6445\(01\)00063-8](https://doi.org/10.1016/S0168-6445(01)00063-8).
- [156] S. Venkata Mohan, L. Agarwal, G. Mohanakrishna, S. Srikanth, A. Kapley, H.J. Purohit, P.N. Sarma, Firmicutes with iron dependent hydrogenase drive hydrogen production in anaerobic bioreactor using distillery wastewater, *Int. J. Hydrogen Energy.* 36 (2011) 8234–8242. <https://doi.org/10.1016/J.IJHYDENE.2011.04.021>.
- [157] B. Pendyala, S.R. Chaganti, J.A. Lalman, S.R. Shanmugam, D.D. Heath, P.C.K. Lau, Pretreating mixed anaerobic communities from different sources: Correlating the hydrogen yield with hydrogenase activity and microbial diversity, *Int. J. Hydrogen Energy.* 37 (2012) 12175–12186. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2012.05.105>.
- [158] I. Moreno-Andrade, J. Carrillo-Reyes, S.G. Santiago, M.C. Bujanos-Adame, Biohydrogen from food waste in a discontinuous process: Effect of HRT and microbial community analysis, *Int. J. Hydrogen Energy.* 40 (2015) 17246–17252. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2015.04.084>.
- [169] K.W. Jung, D.H. Kim, H.S. Shin, A simple method to reduce the start-up period in a H₂-producing UASB reactor, *Int. J. Hydrogen Energy.* 36 (2011) 1466–1473. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2010.09.095>.
- [160] A. Marone, G. Izzo, L. Mentuccia, G. Massini, P. Paganin, S. Rosa, C. Varrone, A. Signorini, Vegetable waste as substrate and source of suitable microflora for bio-hydrogen production, *Renew. Energy.* 68 (2014) 6–13. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2014.01.013>.
- [161] V.C. Kalia, H.J. Purohit, Microbial diversity and genomics in aid of bioenergy, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 35 (2008) 403–419. <https://doi.org/10.1007/s10295-007-0300-y>.

- [162] H. Marchandin, R. Juvonen, A. Haikara, Megasphaera, in: Bergey's Man. Syst. Archaea Bact., American Cancer Society, 2015: pp. 1–16. <https://doi.org/10.1002/9781118960608.gbm00697>.
- [163] A. Ohnishi, Y. Bando, N. Fujimoto, M. Suzuki, Development of a simple bio-hydrogen production system through dark fermentation by using unique microflora, Int. J. Hydrogen Energy. 35 (2010) 8544–8553. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2010.05.113>.
- [164] T. Noike, H. Takabatake, O. Mizuno, M. Ohba, Inhibition of hydrogen fermentation of organic wastes by lactic acid bacteria, Int. J. Hydrogen Energy. 27 (2002) 1367–1371. [https://doi.org/10.1016/S0360-3199\(02\)00120-9](https://doi.org/10.1016/S0360-3199(02)00120-9).

8. APÉNDICE I

Determinaciones fisicoquímicas

8. Apéndice. Procedimientos de las determinaciones fisicoquímicas

8.1 pH

En los sustratos individuales se determinó el valor de pH, para lo cual primeramente se realizó la calibración del equipo de acuerdo a las especificaciones del fabricante, se utilizaron tres puntos (pH 4, 7 y 10). Para la determinación del pH de cada uno de los sustratos fue necesaria la adición de agua destilada, posteriormente se sometió cada muestra a agitación utilizando una placa (*CIMAREC+* Thermo Fisher Scientific). Después de suspender la agitación se dejó reposar la muestra para medir el pH en el sobrenadante. La medición de pH se realizó con el medidor (*Orion Star A35 Thermo Scientific*).

8.2 Humedad y Sólidos

Se determinó el contenido de humedad y sólidos en una estufa (*OGS 180 Thermo Scientific*) llevando a peso constante crisoles de porcelana (tara), posteriormente se colocó una cantidad de la muestra en cada crisol. Se sometió a calentamiento $100 \pm 5^{\circ}\text{C}$ por un periodo de 12 horas, después del calentamiento se colocaron los crisoles en un desecador hasta que alcanzaron la temperatura ambiente para pesar y determinar el contenido de humedad y sólidos totales empleando las siguientes ecuaciones [127]:

$$\% \text{Humedad} = \frac{\text{peso muestra}_{\text{húmeda}} - \text{peso muestra}_{105^{\circ}\text{C}}}{\text{peso muestra}_{\text{húmeda}}} * 100 \quad \text{Ec 4.1}$$

$$\text{ST}(\%) = \frac{\text{peso}_{105^{\circ}\text{C}} - \text{peso}_{\text{tara}}}{\text{peso}_{\text{muestra}}} * 100 \quad \text{Ec. 4.2}$$

Para determinar los sólidos totales volátiles (STV), se utilizó mufla (LindbergblueM: Thermo Scientific), la muestra seca contenida en el crisol de ST, se sometió a calcinación a 550°C durante 30 min. El contenido de Sólidos Totales Volátiles se determina mediante la fórmula:

$$STV(\%) = \frac{\text{peso muestra}_{105^{\circ}\text{C}} - \text{peso muestra}_{550^{\circ}\text{C}}}{\text{peso muestra}} * 100 \quad \text{Ec. 4.3}$$

8.3 Demanda Química de Oxígeno

La DQO de los sustratos, inóculos y reactores en lote se realizó utilizando el método de reflujo cerrado que se basa en la digestión ácida de la muestra, en un tubo de ensayo se colocan 1.5 mL de solución digestora, después se agregan 3.5 ml de solución $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{AgSO}_4$ y 1 mL de muestra, en seguida se coloca el tapón del tubo y se agita, posteriormente se calienta a 150°C durante dos horas en el digestor (Hach® “DRB 200”). Después del tiempo de reacción las muestras se enfrían para medir la absorbancia en un espectrofotómetro UV-Visible (Lambda 365 UV Express, Perkin Elmer) a una longitud de onda de 620 nm [128].

Se realiza una curva de calibración periódicamente utilizando como estándar una solución de biftalato de potasio de concentración $1000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$.

8.4 Nitrógeno total Kjeldahl

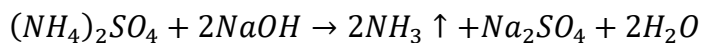
Se determinó el contenido de Nitrógeno total en los sustratos individuales por el método Kjeldahl, que se define como la suma de nitrógeno orgánico y nitrógeno amoniacal, los cuales son convertidos a sulfato de amonio bajo ciertas condiciones de digestión.

El método Kjeldahl se divide en tres procesos básicos de acuerdo a la NMX-AA-026-SCFI-2010 [129]:

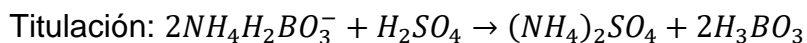
Digestión: la descomposición del nitrógeno orgánico en la muestra se logra empleando una solución ácida.



Destilación: Se adiciona un exceso de álcali a la muestra ácida para convertir el ion NH_4^+ en NH_3 seguido por la ebullición y condensación del NH_3 gas el cual es recibido en una disolución de concentración conocida de ácido bórico



Cuantificación: la cantidad de nitrógeno en la muestra puede ser calculada a partir de la cantidad cuantificada de iones amonio en la disolución de la concentración conocida de ácido bórico.



El procedimiento es el siguiente:

Se toma un volumen de muestra y si es necesario, ajustar el volumen a aproximadamente 500 mL se neutralizar a pH 7, con hidróxido de sodio 12.5 N o ácido sulfúrico 5 N. se coloca la muestra medida en un matraz Kjeldahl de 800 mL.

Añadir 25 mL de la disolución amortiguadora de boratos y ajustar el pH a 9,5 con NaOH 6N. Se transfiere la disolución a un matraz Kjeldahl y añadir unas cuentas de vidrio o perlas de ebullición. Conectar el matraz Kjeldahl al condensador, destilar la muestra cuidando que la temperatura del condensador no pase de 29 °C. Recolectar el condensado en un recipiente que contenga 50 mL de la disolución indicadora de ácido bórico, sumergiendo la punta del condensador o una extensión del mismo por debajo de la superficie del líquido. La destilación se completa cuando se hayan recolectado 300 mL de destilado aproximadamente, incluyendo los 50 mL de la disolución indicadora de ácido bórico. Retirar el matraz colector y titular con disolución de ácido sulfúrico 0,006 N hasta el vire del indicador de verde esmeralda a morado. Registrar el volumen gastado de ácido como volumen A.

Nitrógeno orgánico

Enfriar el residuo contenido en el matraz Kjeldahl

Digestión: Adicionar cuidadosamente 50 mL de reactivo para la digestión al matraz de Kjeldahl y mezclar perfectamente. Añadir unas cuentas de vidrio o

piedras de ebullición. Mezclar y conectar al equipo Kjeldahl; permitir la ebullición de la muestra hasta que el volumen de la disolución se reduzca aproximadamente a un volumen de 25 mL a 50 mL y se observe gran desprendimiento de vapores blancos (estos vapores pueden oscurecerse cuando la muestra presenta grandes cantidades de materia orgánica). NOTA: Si la muestra contiene una cantidad apreciable de material suspendido, añadir 50 mL adicionales de reactivo de digestión. Continuar la digestión durante 30 mín. más. En este período, la disolución cambia de turbia hasta ser transparente e incolora o con una ligera coloración amarillo pálido. Durante la digestión el matraz Kjeldahl debe permanecer inclinado. Enfriar el matraz y su contenido, diluir a 300 mL con agua y mezclar. Cuidadosamente añadir 50 mL de la disolución de hidróxido de sodio, para formar una capa alcalina en el fondo del matraz. Mezclar vigorosamente y verificar que el pH de la disolución sea mayor a 11,0. Conectar el matraz Kjeldahl al condensador, destilar la muestra cuidando que la temperatura del condensador no pase 29 °C.

Recolectar el condensado en un recipiente que contenga 50 mL de la disolución indicadora de ácido bórico), sumergiendo la punta del condensador o una extensión del mismo por debajo de la superficie del líquido. Retirar el matraz colector y titular con disolución de ácido sulfúrico 0,006 mol/L hasta que la disolución vire de color verde esmeralda a morado. Registrar el volumen gastado de ácido como volumen C.

$$\gamma_{NTK} = \gamma_{NNH_3} + \gamma_{Norg} \quad Ec. 4.4$$

$$N_{NH_3} = \frac{(V_A - V_B) \cdot c_{H_2SO_4} \cdot A_r(N)}{V_m} \quad Ec. 4.5$$

Donde:

γ_{NNH_3} Concentración de masa del nitrógeno amoniacal

V_A es el volumen de H_2SO_4 gastados en la titulación de la muestra

V_B es el volumen de H_2SO_4 gastados en el blanco

$c_{H_2SO_4}$ es la concentración de ácido sulfúrico

$A_r(N)$ es la masa atómica del nitrógeno

V_m es el volumen de muestra

$$N_{org} = \frac{(V_C - V_B) \cdot c_{H_2SO_4} \cdot A_r(N)}{V_m} \quad Ec. 4.6$$

Donde:

$\gamma_{N_{org}}$ Concentración de masa del nitrógeno orgánico

V_C es el volumen de H_2SO_4 gastados en la titulación de la muestra

V_B es el volumen de H_2SO_4 gastados en el blanco

$c_{H_2SO_4}$ es la concentración de ácido sulfúrico

$A_r(N)$ es la masa atómica del nitrógeno

V_m es el volumen de muestra

8.5 Carbohidratos

La determinación de carbohidratos se realizó por el método de Dubois *et al.*, conocido como fenol sulfúrico, donde es necesario realizar una curva patrón hecha con glucosa. El procedimiento se realizó colocando en un tubo de ensayo 0.5 mL de muestra, en seguida se añadieron 0.5 mL de fenol al 5% (v/v) y finalmente 2.5 mL de ácido sulfúrico concentrado permitiendo que la reacción ocurra. El fundamento del método es la sensibilidad de los carbohidratos a los ácidos fuertes y a las altas temperaturas. La reacción de color para medir la concentración de carbohidratos solubles depende de la deshidratación de sacáridos hidrolizados a furfural. Los derivados del furfural con las formas del fenol absorben la luz a 490 nm [130].

8.6 Proteínas

El contenido de proteínas fue cuantificado utilizando el método de Lowry, el cual se basa en la reducción del reactivo Folin-Ciocalteu. El proceso de óxido-reducción se caracteriza por la aparición de un color azul debido al complejo

formado con proteínas. Fue necesaria la realización de una curva de calibración con albúmina bovina como estándar y la absorbancia fue medida a 580 nm [131].

